

# **Isolierung und Charakterisierung des *aeneas*-Gens von *Drosophila melanogaster***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Andreas Molitor  
aus Gelsenkirchen-Horst

1. Referent: Prof. Dr. H.-H. Arnold  
2. Referent: Prof. Dr. H. Jäckle  
eingereicht am: 17.10.2002  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.12.2002

### **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeitrag

Molitor A., Jäckle H., Vorbrüggen G.: Isolation of genes involved in directed outgrowth of cells. (Poster) 14. Wissenschaftliche Tagung, Gesellschaft für Entwicklungsbiologie (GfE), Ulm (2001).

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Embryonalentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	2
1.2	Zellwanderung	3
1.2.1	Beispiele für konservierte Proteinfunktionen bei Zellwanderungsprozessen	6
1.3	Polzellbildung und -wanderung	8
1.3.1	Genetische Steuerung der Polzellwanderung	10
1.4	Entstehung des embryonalen Muskelmusters	11
1.4.1	Frühe Unterteilung des Mesoderms	13
1.4.2	Aufbau des frühen Muskelmusters	13
1.4.3	Signalübertragungs-Vorgänge	14
1.4.4	Prozesse der Muskelmuster-Bildung und Muskel-Differenzierung	15
1.5	Fehlexpressions-„Screen“	17
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>19</b>
2.1	Fehlexpressions-„Screen“ zur Erzeugung von letalen Muskelphänotypen	19
2.2	Kandidaten-Linien, die zur Letalität im Fehlexpressions-„Screen“ führten	20
2.2.1	Zusammenfassung der Kandidaten aus dem Fehlexpressions-„Screen“	21
2.2.2	Auswahlkriterien für weitergehende Analysen von Kandidaten-Linien	24
2.3	Wirkungsnachweis des Fehlexpressions- „Screens“	24
2.3.1	Fehlexpressions-Phänotyp von <i>P{EP}21140</i> und Expression von <i>Syndecan</i>	24
2.3.2	Fehlexpression von <i>P{EP}36772</i> und Expression von <i>Toll</i>	27
2.4	Die <i>P{EP}35059</i> -Insertion im annotierten Gen <i>CG4963</i>	28
2.5	Analyse des <i>aeneas</i> -Gens ( <i>CG14648</i> )	31
2.5.1	Fehlexpressionsphänotyp des <i>aeneas</i> -Gens	31
2.5.2	Embryonale Expression des <i>aeneas</i> -Gens	33
2.5.3	Northern Blot-Analyse	35
2.5.4	Subzelluläre Lokalisation des Aeneas-Proteins	36
2.6	Molekulare Charakterisierung des <i>aeneas</i> -Gens	37
2.6.1	Aeneas Protein-Domänen	40
2.7	Charakterisierung der <i>P{lacW}l(3)L1233</i> -Linie	42
2.7.1	Trennung von <i>P{lacW}</i> -Insertion und Sekundärmutation mittels Rekombination	44
2.8	RT-PCR Analyse der <i>l(3)L1233<sup>R80</sup></i> -Linie	46
2.9	<i>aeneas</i> wird für die ersten Schritte der Polzellwanderung benötigt	48
2.10	Remobilisierung des <i>P{lacW}</i> -Elements der <i>l(3)L1233<sup>R80</sup></i> -Linie	50
2.11	Gestörte Polzellwanderung in <i>Δl(3)L1233<sup>R80-C2</sup> / Df(3R)Z1</i> -Embryonen	54

<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
3.1	Der modulare Fehlexpressions-, „Screens“	56
3.2	Die Fehlexpressions-Situation	57
3.3	Molekulare Charakterisierung der identifizierten Gene	58
3.4	Funktionelle Gruppierung der identifizierten Gene	59
3.5	Beteiligung von Kandidaten-Gene bei der Muskelentwicklung	63
3.6	Vergleich mit anderen Fehlexpressions-, „Screens“	64
3.7	Fehlexpressions-Phänotyp des <i>aeneas</i> -Gens	65
3.8	Charakterisierung des <i>aeneas</i> -Gens	66
3.8.1	Embryonale Expression des <i>aeneas</i> -Gens	66
3.8.2	Subzelluläre Lokalisation des Aeneas-Proteins	66
3.8.3	Aeneas Protein-Domänen	66
3.9	Das <i>l(3)LI233<sup>R80</sup></i> -Allel	67
3.10	Funktion des <i>aeneas</i> -Gens	67
3.11	Phänotypische Variabilität des <i>l(3)LI233<sup>R80</sup></i> -Allels	68
3.12	Remobilisierung des <i>P{lacW} l(3)LI233<sup>R80</sup></i> -Elements	69
3.13	Phänotyp der transheterozygoten <i>Δl(3)LI233<sup>R80-C2</sup> / Df(3R)ZI</i> -Linie	70
3.14	Erklärungsmöglichkeiten des <i>aeneas</i> -Phänotyps	71
3.15	Weiterführende Experimente zur Charakterisierung von Aeneas	73
<b>4</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>74</b>
4.1	Molekularbiologie	74
4.1.1	Vektoren	74
4.1.2	DNA-Konstrukte	74
4.1.3	Molekulare Charakterisierung des <i>aeneas</i> -Lokus	75
4.1.4	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	75
4.1.5	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab	75
4.1.6	Präparation von genomischer DNA	75
4.1.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	76
4.1.8	Autoradiographie	76
4.1.9	Sequenzanalyse von DNA	76
4.1.10	„plasmid rescue“ von genomischer DNA	76
4.1.11	Inverse PCR auf genomischer DNA	77
4.1.12	PCR auf genomischer DNA	78
4.1.13	Präparation von poly(A) <sup>+</sup> -RNA	79
4.1.14	Northern-Hybridisierung	79
4.1.15	Herstellung von „antisense“-RNA-Sonden	80

4.1.16	Transkriptspezifische RT-PCR-Analyse der <i>aeneas</i> -RNA	80
4.2	Histologie und Embryologie	81
4.2.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung an Embryonen	81
4.2.2	Antikörperfärbung von Embryonen	82
4.3	Genetik	83
4.3.1	Fliegenstämme	83
4.3.2	Keimbahntransformation	83
4.3.3	<i>P{lacW}</i> -Element-Exzision	84
4.3.4	Ektopische Expression von <i>aeneas</i> mit Hilfe des Gal4/UAS-Systems	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen</b>	<b>102</b>

**Abkürzungen**

aa	Aminosäuren
<i>aen</i>	<i>aeneas</i> -Gen
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare (Längenangabe für DNA)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat
BDGP	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
BSA	Rinderserumalbumin (Protein)
cDNA	zu mRNA komplementäre DNA
c.a.	circa
CoA	Coenzym A
$\Delta 2-3$	stabil in das Genom integrierte Transposasequelle
D(a)	Dalton (Atom-/Molekulargewicht)
DAB	Diaminobenzidin
DIG	Digoxygenin
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Komplexierungsreagenz für Metalle)
EST	"expressed sequence tag"
h	Stunde
kb	kilo-Basen-Paare (Längenangabe für DNA)
kD	kilo-Dalton (Massenangabe bei großen Molekülen)
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mRNA	Boten-RNA
NBT	Nitroblautetrazoliumsalm
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	offener Leserahmen eines Gens
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (für die PAGE)
s.o.	siehe oben
sec	Sekunden
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Substanz für Pufferlösungen)
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UTR	untranslatierte Region einer RNA
Vol.	Volumen
z.T.	zum Teil



**Abb. 1-1: „Der Sturm“ (Aeneas Darstellung)**  
***mens agitat molem: der Geist bewegt die Materie***  
**„Aeneis“ (6, 727): Vergil (29 v. Chr.)**

## **1 Einleitung**

Die „Aeneis“, das große Nationalepos, begründete den Ruhm Vergils als bedeutendster Dichter des alten Roms. In zwölf Büchern erzählt Vergil von den Irrfahrten und Heldentaten des Aeneas, dem Stammvater der Römer.

Der Sage nach locken die Sirenen vorüberfahrende Seefahrer durch Gesänge und Zauber auf ihre Insel, um sie zu töten. In der „Aeneis“ erliegt der Steuermann von Aeneas dem Gesang der Sirenen, wird von diesen auf die Klippen gelockt und ertrinkt. Aeneas übernimmt selbst das Steuer und umschifft die felsige Küste der Insel. Analog zu dieser Metapher wird die Zellnavigation von anziehenden bzw. abstoßenden Signalen und Adhäsionsprozessen beeinflusst. Ob eine Mutation im *aeneas*-Gen zu einer „Irrfahrt“ von primordialen Keimzellen im *Drosophila*-Embryo führt, wird in dieser Arbeit untersucht.

Der experimentelle Zugang zu Zellmigrations-Prozessen während der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* wird durch spezifische Eigenschaften des Systems unterstützt. Die multizellulären Gewebe des Tauflieden-Embryos sind streng definiert (Übersicht: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Die relativ kurze Generationszeit der Fliege ermöglicht genetische und entwicklungsbiologische Untersuchungen in kurzen Zeiträumen und hohen Quantitäten. Zudem sind zahlreiche genetische und molekularbiologische Methoden im *Drosophila*-System etabliert. Im März 2000 wurde die Genomsequenz der Taufolie veröffentlicht (Adams et al., 2000; Myers et al., 2000), womit Computer-Vorhersagen von *Drosophila*-Genen nun vergleichenden Untersuchungen zugänglich sind und die Zuordnung von Mutationen zu Genen stark vereinfacht wurde.

## **1.1 Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster***

Die Embryonalentwicklung von *Drosophila* ist bei einer Temperatur von 25° C nach 22 Stunden abgeschlossen. Um die Bestimmung des Alters eines Embryos zu erleichtern, wurde die Embryogenese in 17 Stadien unterteilt (Übersicht: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Unmittelbar nach der Befruchtung vollzieht sich eine für Insekten typische „superfizielle“ Furchung (Übersicht: Driever, 1993). Dabei werden die Kernteilungen nicht von den entsprechenden Zellteilungen begleitet. Als Folge entwickelt sich der Embryo zunächst als Plasmodium (englisch: „syncytium“), in dem regulatorische Faktoren ungehindert von Zellwänden diffundieren können (St Johnston, 1995). Nach der siebten Kernteilung beginnt ein Großteil der Zellkerne an die Peripherie des Eis zu wandern (Foe und Alberts, 1983). Etwa zehn Kerne erreichen nach der achten Kernteilung das posteriore Polplasma. Hier entstehen im Stadium 3 die ersten Zellen des Embryos, die von einer Membran umschlossen sind. Aus diesen sogenannten „Polzellen“ werden später die Keimzellen hervorgehen (Übersicht: Williamson und Lehmann, 1996; Abb. 1-4). Nach der zehnten Kernteilung ordnen sich die restlichen, somatischen Kerne einschichtig im Periplasma an. In diesem sogenannten „synzytialen Blastoderm“ befinden sich etwa 5.000 somatische Zellkerne an der Eioberfläche, die jeweils von einem Zytoskelett umschlossen sind ohne dass die Kerne von einer Zellmembran gegeneinander abgegrenzt werden (Foe und Alberts, 1983). Anschließend werden die Kerne durch Zellmembranen voneinander getrennt (Turner und Mahowald, 1976). Es entsteht ein einschichtiges Epithel, das sogenannte „zelluläre Blastoderm“ (Stadium 5).

In der nachfolgenden Gastrulation kommt es zu weitgreifenden morphologischen Veränderungen des Embryos. Die drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Endoderm werden ausgebildet (Übersicht: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Leptin, 1999). Entlang der Mittellinie entsteht die sogenannte Ventralfurche (Stadium 6). Sie wird durch invaginierende Zellen der Mesodermanlage gebildet (Leptin und Grunewald, 1990). Mesodermalen Ursprungs sind das Fettgewebe, das larvale Herz und Aorta, die viszerale und somatische Muskulatur, sowie der mesodermale Teil der Gonaden (Borkowski et al., 1995; Riechmann et al., 1997; Riechmann et al., 1998; Übersicht: Bodmer und Frasch, 1999). Die Gastrulation wird von der Keimstreifausstreckung überlagert, dabei wird das Hinterende des Embryos dorsal-anterior bis zur Kopfreion geschoben (Stadium 7). Am Vorderende der Ventralfurche invaginiert die endodermale Anlage des vorderen Mitteldarms. Am posterioren Ende kommt es zur „amnioproktodealen“ Invagination von Zellen, die den hinteren Teil des Mitteldarms sowie den Enddarm bilden (Übersicht: Skaer, 1993). Die Polzellen bewegen sich zusammen mit der posterioren Mitteldarmanlage ins Innere des Embryos (Stadium 8; 1.3).



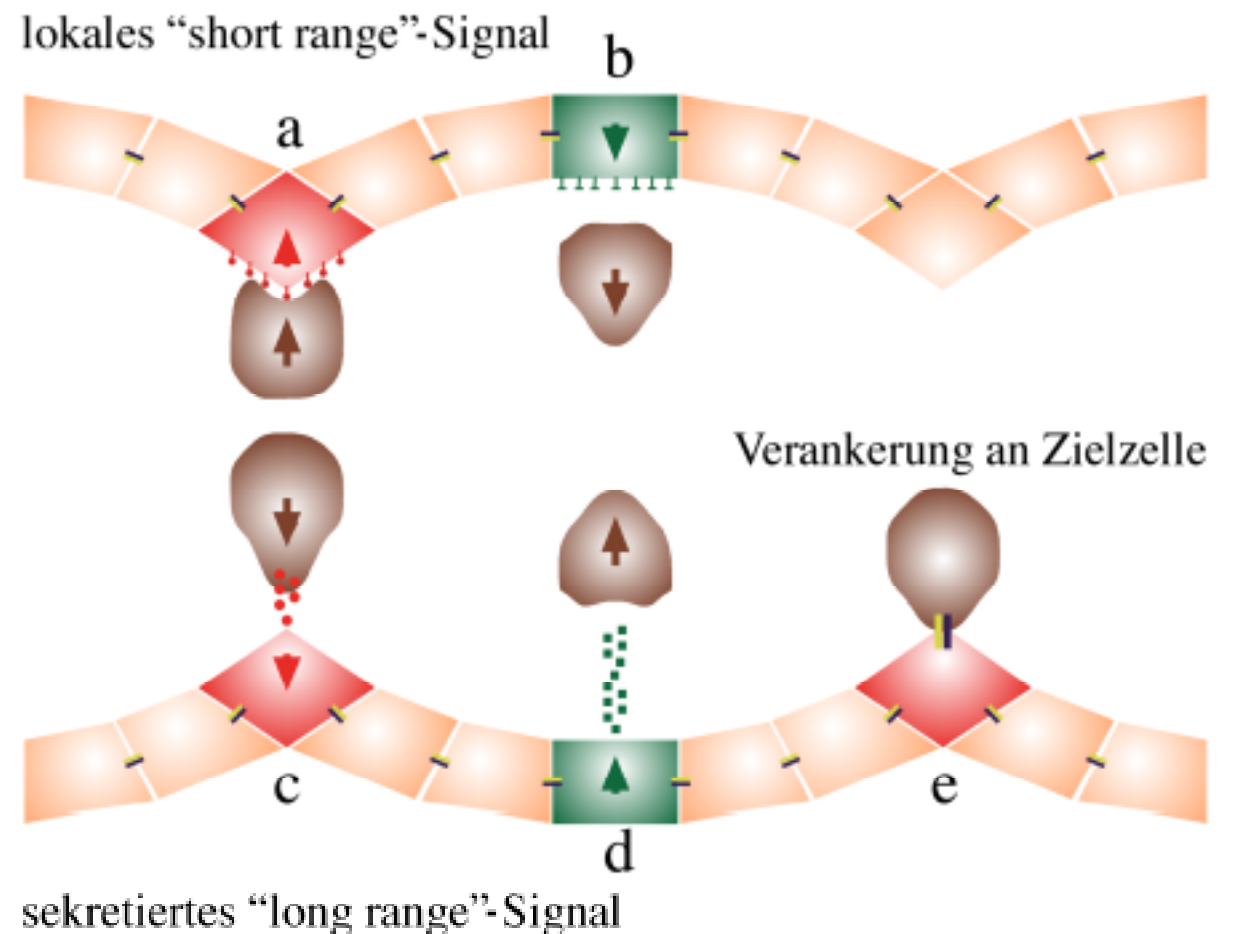
Die überwiegende Zahl von nicht invaginierten Zellen repräsentiert das Ektoderm, aus dem die Zellen des Tracheensystems, das zentrale und periphere Nervensystem, sowie die Epidermis hervorgehen (Bate, 1976; Schmidt et al, 1997; Übersicht: Campos-Ortega, 1995).

Die Bildung des Tracheensystems beginnt zum Zeitpunkt des ausgestreckten Keimstreifs (Stadium 11) mit der Determinierung trachealer Zellgruppen aus lateralen epidermalen Zellen, die als tracheale Metamere bezeichnet werden (Übersicht: Manning und Krasnow, 1993). Durch koordinierte Zellbewegungen invaginieren die Metamere in das Innere des Embryos und bilden tubuläre Tracheenäste aus, die sich nach einem stereotypen Muster verzweigen (Stadium 12; Abb. **1-3 a**). Da während der Tracheenbildung keine Zellteilung mehr erfolgt, beruht diese Astbildung auf morphogenetischen Bewegungen (Sutherland et al, 1996).

Im Stadium 12-13 der Embryonalentwicklung verkürzt sich der Keim wieder (Costa, et al 1993; Irvine und Wieschaus, 1994). Gleichzeitig wird äußerlich die Segmentierung sichtbar und die inneren Organe differenzieren sich aus. Die somatischen mesodermalen Zellen wandern zu ihrer Endposition in jedem Segment, wo sie zu Muskeln differenzieren (**1.4**). Nach der Verkürzung des Keimstreifs erfolgt der Dorsalschluss des Embryos durch Streckung der lateralen Epidermis (Stadium 15). Der Embryo entwickelt am Ende des Stadiums 16 die Gestalt der schlüpfbereiten Larve. Die nun fertig entwickelte Larve in der Eihülle zeigt die segmentspezifischen Kutikulastrukturen. Da bei *Drosophila* die Kopfsegmente in das Innere des Embryos bzw. der Larve zurückgezogen sind, erkennt man 11 Segmente: die Thorakalsegmente 1-3 und caudal daran anschließend die Abdominalsegmente 1-8. (Übersicht: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997).

## **1.2 Zellwanderung**

Zellwanderung ist die Bewegung einzelner Zellen in ihrer Umgebung und steht morphogenetischen Bewegungen, wie sie bei der Gastrulation oder Neurulation auftreten, gegenüber. Zellmigration umfasst sowohl die Lokomotion der gesamten Zelle, als auch die Formveränderung oder extrazelluläre Anheftung von Zellen. Zellwanderung ist für eine Reihe normaler und pathologischer Prozesse entscheidend, wie der Zell- und Gewebeentwicklung, Wundheilung, Immunantwort und der Metastasierung von Tumoren (Übersicht: Lauffenburger und Horwitz, 1996). Um ihre biologische Funktion während der Entwicklung von Organismen zu erfüllen, müssen viele Zellen vom Ort ihrer Bildung zu entfernt liegenden Stellen im Embryo wandern (Dixon, 1994). Zellmigration ist ein komplexer Prozess, der dynamische Interaktionen zwischen den migrierenden Zellen und den durchwanderten Geweben erfordert. Um diese zu ermöglichen, müssen Zellen ihre Form und Adhäsionseigenschaften ändern, zum Teil invasiv werden, oder ein selbständiges Bewegungsvermögen erlangen. Unter Adhäsion versteht man den spezifischen, rezeptor-



Migrierende Zellen müssen in der Lage sein, richtungsgebende Signalmoleküle zu erkennen, die vom Zielgewebe bereitgestellt werden, um Wanderungsprozesse zu initiieren. Diese Signale bestimmen bzw. beeinflussen den Migrationsweg und das Ziel der Zellwanderung. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Zellen durch attraktive bzw. repulsive Signalmoleküle zu ihren Zielorten geführt werden (Übersicht: Montell, 1999). Diese Moleküle können extrazellulär diffusibel agieren und die Migration auf Distanz beeinflussen, oder durch direkte Zell-Zell-Kontakte, über rezeptorvermittelte Signaltransduktionsketten, eine Änderung des genetischen Programms in Zielzellen bewirken (Übersicht: Forbes und Lehmann, 1999; Abb. 1-2).

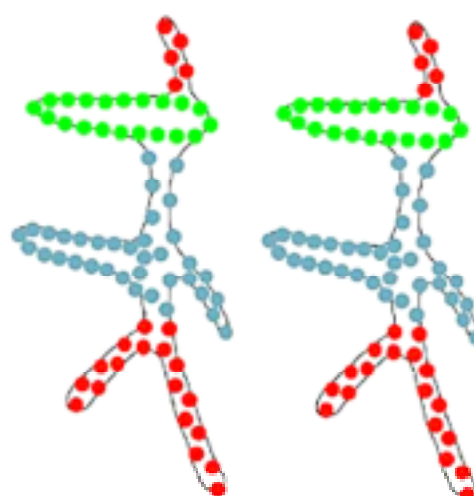
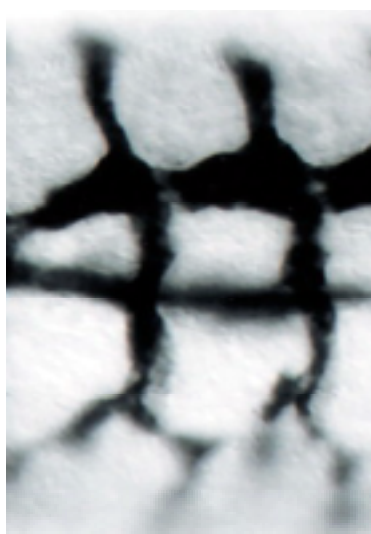
Migration wurde intensiv im Zellkultursystem untersucht. Die Mechanismen, welche die Zellwanderung im lebenden Embryo steuern, sind dagegen erst rudimentär verstanden. *In vitro* Studien lieferten putative Faktoren, welche Migrationsprozesse in Zellkultur-experimenten kontrollieren (Übersicht: Lauffenburger und Horwitz, 1996). Diese Faktoren können jedoch nur *in vivo* auf ihre Wirksamkeit in einer natürlichen Umgebung überprüft werden. Eine Aufklärung der *in vivo*-Aktivität dieser Faktoren, in einem Modellsystem wie z.B. *Drosophila*, ist eine logische Konsequenz. Ein wesentlicher experimenteller Ansatz zur Identifizierung und Charakterisierung von Genen, welche für die Zellwanderung und deren Regulation in einem Organismus verantwortlich zeichnen, sind saturierende genetische „Screens“, die bei *Drosophila* durchgeführt werden können (Duchek und Rørth, 2001). Migrationsprozesse können hier an verschiedenen Organ-Systemen untersucht werden, bei deren Bildung Zellwanderung eine bedeutende Rolle spielt. Drei Beispiele für Zellwanderungsprozesse während der Organogenese von *Drosophila melanogaster* sind im Folgenden aufgeführt (Abb. 1-3):

#### gerichtetes tracheales Zellwachstum

*in vivo*

Schema

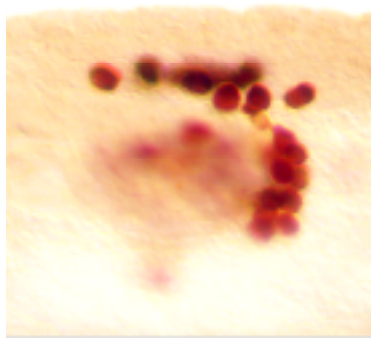
beteiligte Gene



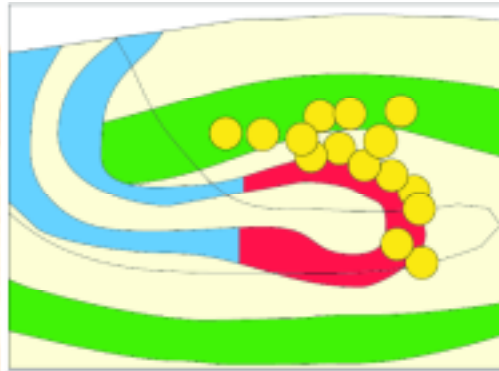
*spalt; knirps*  
(Transkriptionsfaktoren)  
*torpedo*  
(EGF-Rezeptor)  
*drifter*  
(Transkriptionsfaktor)  
*branchless*  
(FGF)  
*breathless*  
(FGF-Rezeptor)  
*hedgehog*  
(Rezeptor-Ligand)  
*dpp*  
(TGF- $\beta$ )

a

## Migration der Polzellen *in vivo*



### Schema



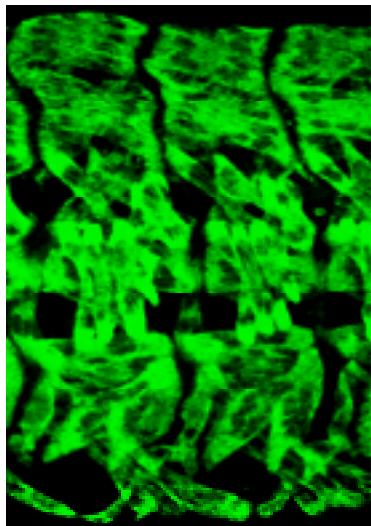
### beteiligte Gene

*columbus*  
(HMG CoA Reduktase)  
*wunen; wunen2*  
(Lipid-Phosphatase)  
*hedgehog*  
(Rezeptor-Ligand)  
*D-Six4*  
(Transkriptionsfaktor)

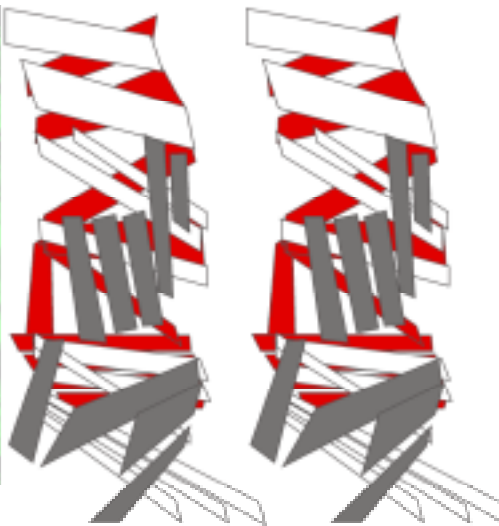
**b**

## gerichtetes Wachstum beim Muskelmuster-Aufbau

*in vivo*



### Schema



### beteiligte Gene

*stripe*  
(Transkriptionsfaktor)  
*roundabout*  
(Rezeptor)  
*slit*  
(EGF-Domäne)  
*derailed*  
(Rezeptor-Tyrosin-Kinase)  
*heartless*  
(FGF-Rezeptor)  
*D-Six4*  
(Transkriptionsfaktor)  
*dpp*  
(TGF- $\beta$ )

**c**

Abb. 1-3: Zellwanderungsprozesse in *Drosophila melanogaster*

- a) Tracheales Zellwachstum
- b) Migration der Ur-Keimzellen
- c) Gerichtetes Wachstum beim Muskelmusteraufbau.

Die rechts aufgeführten Gene sind Beispiele für Faktoren, die Wanderungsvorgänge von Zellen in den drei *Drosophila*-Systemen (a, b, c) steuern.

### 1.2.1 Beispiele für konservierte Proteinfunktionen bei Zellwanderungsprozessen

Das Studium dieser und anderer experimenteller Systeme für Zellmigrationsprozesse während der Organogenese führte zu einem Einblick in die regulatorischen Mechanismen, die gerichteter Zellwanderung zugrunde liegen. Die identifizierten Genfunktionen wirken bei unterschiedlichen Prozessen der Migration. Sie sind an der Produktion von Signalmolekülen, die Zellwanderung steuern, beteiligt, bewirken intrazelluläre Signaltransduktion und steuern molekulare Mechanismen, die zur Migration der Zielzellen führen. Die identifizierten Proteinfunktionen, die Zellwanderung steuern, sind oftmals in den verschiedenen Systemen in

einem unterschiedlichen zellulären Kontext konserviert. Die FGF-Signaltransduktionskaskade ist ein solches Beispiel. Der *Drosophila* Fibroblasten-Wachstumsfaktor-(FGF)-Rezeptor I *breathless (btl)* ist für die geleitete Astbildung der Tracheen verantwortlich (Lee et al., 1996; Sutherland et al., 1996). Die Aktivität des Btl-Rezeptors wird durch die lokalisierte Akkumulierung seines Liganden Branchless (Bnl) ausgelöst. Bnl wirkt als „chemoattractant“ und führt Tracheen-Zellen zu ihren Zielzellen (Sutherland et al., 1996; Metzger und Krasnow, 1999). Der zweite *Drosophila* Fibroblasten-Wachstumsfaktor-(FGF)-Rezeptor II wird durch das *heartless-(htl)*-Gen kodiert und ist für das gerichtete Auswachsen des invaginierenden Mesoderms verantwortlich, sein Ligand ist noch nicht identifiziert worden (Gisselbrecht et al., 1996; Shishido et al., 1997; Wilson und Leptin, 2000). In Htl-mutanten Embryonen erfolgt kein Wachstum des Mesoderms im dorsalen Bereich, so dass die Herzvorläuferzellen und dorsale somatische Muskeln fehlen (Beiman et al., 1996). Die FGF-Signaltransduktionskaskade ist also sowohl für gerichtete Wachstumsprozesse im respiratorischen System, als auch im Mesoderm notwendig (Dossenbach et al., 2001).

Auch die (EGF)-rezeptorvermittelte Signaltransduktion spielt bei Migrationsprozessen in verschiedenen Modellsystemen eine wichtige Rolle (Übersicht: Perrimon und Perkins, 1997). Das Auswachsen des trachealen Dorsalstamms (Vincent et al., 1997) und die dorsale Wanderung der „border cells“ während der Oogenese wird durch den *Epidermal growth factor receptor (Egfr)* gesteuert (Duchek und Rørth, 2001). Auch bei der Spezifizierung der „ventral acute 2“-Muskelvorläuferzellen (VA2) ist die *Egfr*-Signaltransduktion essenziell (Buff et al., 1998; Halfon et al., 2000; Johnson Hamlet und Perkins, 2001).

Das Hedgehog (Hh)-Protein wirkt als Signalmolekül bei der Unterteilung und Differenzierung der Tracheenäste (Glazer und Shilo, 2001). Ebenso dient *hedgehog* als ein anziehender Signalstoff bei der Keimzellwanderung (Deshpande et al., 2001). D-Six4 ist bei Zellerkennungsprozessen während der Myoblastenfusion und zusätzlich bei Keimbahn-Soma-Interaktionen involviert (Kirby et al., 2001).

Weitere Beispiele für mehrfach genutzte Faktoren bei gesteuerten Wanderungsprozessen sind *slit* und *roundabout*. Das Slit-Protein (Rothberg et al., 1990), das von den Mittellinien-Zellen des zentralen Nervensystems sekretiert wird, bindet an den Roundabout-(Robo)-Rezeptor (Seeger et al., 1993) und wirkt als „short-range-repellent“ bei der Kontrolle der Überkreuzung von Axonen der Mittellinie (Kidd et al., 1999). Slit wirkt aber auch auf wandernde mesodermale Zellen, sowohl in abstoßender als auch in anziehender Weise. Mesodermzellen, die den Robo-Rezeptor exprimieren, wandern zunächst weg von der Slit-exprimierenden Mittellinie. Einige Stunden nach dieser Migration ändern dieselben Zellen ihr Verhalten. Sie wandern nun zu den Slit-exprimierenden Muskelanheftungsstellen, ein Prozess in dem ebenfalls Robo benötigt wird (Kramer et al., 2001).

Aufgrund der genannten häufigen vorkommenden multiplen Verwendung dieser Proteine, sollten die in genetischen „Screens“ gefundenen Faktoren, die bei der Zellmigration in einem System beteiligt sind, auch in anderen Systemen auf eine putative Rolle bei Wanderungsprozessen untersucht werden. Zwei der oben vorgestellten Systeme werden nachfolgend genauer beschrieben.

### **1.3 Polzellbildung und -wanderung**

Die Ur-Keimzellen sind die ersten Zellen, die im *Drosophila*-Embryo gebildet werden (Zalokar und Erk, 1976). Diese, auch Polzellen genannten, Keimzellvorläufer entstehen am posterioren Ende des Embryos (Blastoderm-Stadium). Während der ersten Stunde der Embryonalentwicklung erscheint das posteriore Pol- oder Keimplasma als helle Zone am hinteren Ende des befruchteten Taufliegen-Eis. Im Polplasma befinden sich granuläre Partikel, die Keimbahndeterminanten enthalten (Illmensee und Mahowald, 1974; St Johnston, 1991). Das *oskar*-Gen (*osk*) (Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1986) ist ein Schlüsselfaktor in diesem Determinierungsprozess (Smith et al., 1992). Die *oskar*-mRNA ist am hinteren Pol lokalisiert, und das Oskar-Protein wird am posterioren Pol synthetisiert. Der Lokalisationsort der *oskar*-RNA bestimmt, wo sich die Ur-Keimzellen ausbilden. Die Menge an Oskar-Protein legt außerdem fest wie viele Polzellen sich bilden (Ephrussi und Lehmann, 1992). Das Vasa-Protein, eine ATP-abhängige RNA-Helikase, spielt bei der *oskar*-Lokalisierung eine wichtige Rolle (Breitwieser et al., 1996). Ab Kernteilung 7 wandern etwa zehn Zellkerne vom Zentrum des synzytialen Embryos in das Polplasma. In zwei verlangsamten Zellteilungen entstehen die etwa 40 Ur-Geschlechtszellen (Übersicht: Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Während der Embryonalentwicklung der meisten Organismen werden die Ur-Keimzellen schon früh von jenen Zellen getrennt, welche die Organe und Gewebe des Körpers bilden (Nieuwkoop und Sutasurya, 1979; Dixon, 1994). Ferner erfolgt eine räumlich getrennte Determinierung der Keimzellen und der somatischen Gonadenzellen, so dass die Keimzellvorläufer auf einem festgelegten Weg durch den sich entwickelnden Embryo wandern müssen, bis sie auf die somatischen Gonadenvorläuferzellen treffen (Boyle und DiNardo, 1995; Übersicht: Starz-Gaiano und Lehmann, 2001). Ursprünglich ist die Form der Ur-Keimzellen annähernd kugelförmig. Umfangreiche Gestaltänderungen der Keimzellvorläufer spielen sich bereits zu Beginn der Gastrulation ab: Die Polzellen elongieren und bilden Filopodien aus (Jaglarz und Howard, 1995). Vor der Keimbandverlängerung sind die Keimzellen im engen Kontakt zueinander, und die Filopodien weisen in verschiedene Richtungen. Die Polzellen heften sich an die unterliegende Zellschicht, die Anlage des posterioren Mitteldarms. Während der Gastrulation erfolgt die Ausstreckung des Keimstreifs, und das Mitteldarm-Primordium invaginiert. Die Ur-Keimzellen werden zusammen mit dem Mitteldarm-Primordium passiv in das Innere des Embryos befördert (Übersicht: Skaer, 1993).



a) Keimzellen-Bildung



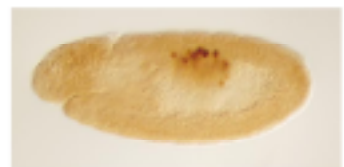
b) Keimband-Ausstreckung



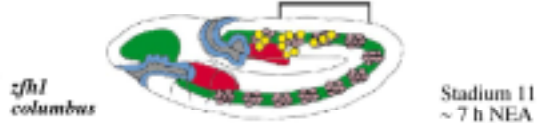
c) Wanderung durch Mitteldarm



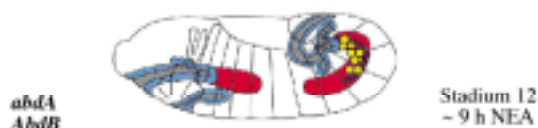
d) Wanderung: Mitteldarm-Mesoderm



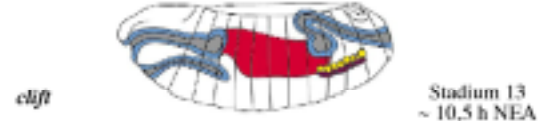
e) Verankerung am lateralen Mesoderm



f) Ausrichtung am Gonaden-Mesoderm



g)



h) Gonaden-Koaleszenz

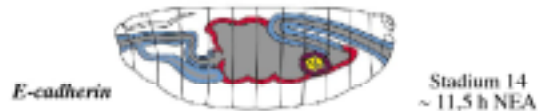


Abb. 1-4: Schritte der Keimzellwanderung in *Drosophila* (Starz-Gaiano und Lehmann, 2001)

links: Schematische Darstellung (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Farbcode: Polzellen (gelb); Mesoderm (grün); Vorder- & Hinterdarm (blau); Mitteldarm (rot); laterales Mesoderm (hell-lila); somatische Gonadenvorläufer (dunkel-lila); Gene, die bei den verschiedenen Polzell-Migrationsschritten involviert sind. Embryonalstadien 5-14, NEA = nach Ei-Ablage.

rechts: Die Keimzellen wurde mithilfe des  $\alpha$ Vasa-Antikörpers (P. Lasko) angefärbt.

Nachfolgend wandern die Polzellen aktiv durch das Darmepithel (Abb. 1-4 c; Jaglarz und Howard, 1994), bewegen sich zunächst dorsal an der Außenseite des Darms (Abb. 1-4 d) und migrieren danach in das darüberliegende Mesoderm (Abb. 1-4 e; Zhang et al., 1996). In *huckebein*-Mutanten, in welchen Mitteldarm- zu Hinterdarmgewebe transformiert ist, können die Polzellen nicht durch das Darmepithel wandern und verbleiben im Darm-Rudiment (Brönner und Jäckle, 1996). Nachdem sie das Mesoderm erreicht haben, spalten sich die Polzellen in zwei Gruppen auf, welche dann lateral abwandern bis sie auf jeder Seite des Embryos mit den mesodermalen Gonadenvorläufern aus den Abdominalsegmenten 4 - 7 in Verbindung treten (Abb. 1-4 f+g; Kusch und Reuter, 1999). Danach verschmelzen die beiden Zellpopulationen zur embryonalen Gonade (Abb. 1-4 h; Moore et al., 1998), die sich während der larvalen und pupalen Stadien zum Ovar bzw. Testikel differenziert. Hier finden Zell-Zell-Interaktionen statt, die für die Morphogenese der Ovarien bzw. Testikel wichtig sind, und die Differenzierung von Polzellen in Keimbahn-Stammzellen, welche sich zu den Eizellen bzw. Samenzellen entwickeln, beeinflussen (Boyle und DiNardo, 1995).

### **1.3.1 Genetische Steuerung der Polzellwanderung**

Eine Besonderheit der Polzellen ist, dass in ihnen die zygotische Transkription bis etwa zur Mitte der Embryonalentwicklung (Stadium 8-9) unterdrückt ist (Kobayashi et al., 1996). Die frühen Prozesse der Polzelldetermination werden durch maternal eingelagerte Effektorgene gesteuert (Übersicht: Mahowald, 2001). Diese maternalen Effektorgene sind auch für die Keimzellwanderung wichtig. Zwei solche zellautonom wirkende Faktoren, welche die Polzellwanderung beeinflussen, sind das Nanos-Protein (Nos) und sein regulatorischer Partner Pumilio (Pum) (Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1986; Asaoka-Taguchi et al., 1999). In der Nachkommenschaft von Weibchen, denen *nanos*- oder *pumilio*-Genaktivität fehlt, wandern die Keimzellvorläufer nicht zielgerichtet und verschmelzen nicht mit den somatischen Gonadenvorläufern (Deshpande et al., 1999). Der Grund für die Migrationsdefekte in diesen Embryonen ist vermutlich eine Störung der Hemmung der zygotischen Transkription (s.o.) in den Polzellen (Forbes und Lehmann, 1998). Das Paar-Regel-Gen *even skipped* (*eve*) und Segmentpolaritätsgene, wie z.B. *hedgehog* (*hh*) (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980), sind für die Spezifikation und Differenzierung der somatischen Gonadenvorläuferzellen entscheidend (Riechmann et al., 1998). Die Fehlexpression des *hh*-Gens mithilfe eines UAS<sup>hh</sup>-Konstrukts und verschiedenen gewebespezifischen Gal4-Treibern führt in allen Fällen zu einer Migration der Polzellen in Richtung der ektopischen Hh-Proteinquelle (Deshpande et al., 2001). Hedgehog dient also vermutlich, neben seiner Rolle bei der Spezifizierung der somatischen Gonadenvorläufer (Moore et al., 1998), als anziehendes Signalmolekül bei der Zielfindung der Keimzellen.



Das ZFH1-Protein (*Zn finger homeodomain 1*) ist wichtig für die Migration des caudal-viszeralen Mesoderms, und damit indirekt für die Wanderung der assoziierten Polzellen (Broihier et al., 1998; Kusch und Reuter, 1999). Die homeotischen Gene *abdominal A* (*abdA*) und *Abdominal B* (*AbdB*) determinieren drei mesodermale Gruppen in den abdominalen Segmenten, die das Gonaden-Mesoderm bilden. In Mutationen dieser Gene findet keine Assoziation der Polzellen mit den mesodermalen Gonadenvorläufern statt (Boyle und DiNardo, 1995; Riechmann et al., 1998). Während der Verschmelzung der Gonade (Koaleszenz) sind Adhäsionsmoleküle wie *E-cadherin* (*shotgun*) beteiligt (Moore et al., 1998).

Die gerichtete Migration der Polzellen wird auch durch nicht zellautonome, anziehende bzw. abstoßende Faktoren gelenkt. Beispiele sind die redundant wirkenden Gene: *wunen* (*wun*) (Zhang et al., 1996) und *wunen-2* (*wun-2*) (Starz-Gaiano et al., 2001). Beide Gene kodieren für eine Phospholipid-Phosphatase. Eine Mutation in nur einem der beiden Gene hat keinen Effekt auf die Keimzellenwanderung. In Embryonen, denen das *wunen*- und das *wunen-2*-Transkript fehlt, ist dagegen die Migration der Polzellen entlang des Mitteldarms gestört. In den Mitteldarmzellen, die normalerweise von den Ur-Keimzellen gemieden werden, sind *wun* und *wun-2* in einem identischen Muster transkribiert. Eine räumlich begrenzte Hydrolyse von Phospholipiden bildet vermutlich einen Gradienten von Signalen, die auf wandernde Keimzellen abstoßend wirken (Starz-Gaiano et al., 2001). Die Fehlexpression beider Gene im Mesoderm, einem Polzellen-anziehenden Gewebe, veranlasst die Keimzellen diesem Gewebe auszuweichen (Starz-Gaiano et al., 2001). Das *columbus*-Gen (*clb*) (Übersicht: Howard, 1998) kodiert für das Taufliegen-Homolog der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A (HMG CoA)-Reduktase (*hmgcr*) (Van Doren et al., 1998). Dieses Enzym katalysiert einen regulatorischen Schritt der Cholesterin-Synthese in Säugetieren (Übersicht: Luskey, 1988). Es ist bei *Drosophila* für das Auswandern der Polzellen aus dem Mitteldarm und deren Assoziation mit den mesodermalen Gonadenvorläufern notwendig. Das *clb*-Gen ist normalerweise stark im Gonaden-Mesoderm exprimiert, und die Wanderung der Polzellen kann zu Geweben umgeleitet werden, in denen *columbus* ektopisch fehlexprimiert wird (Van Doren et al., 1998). Ein Modell geht davon aus, dass die HMG-CoA-Reduktase einen für Keimzellen anziehend wirkenden Faktor produziert. Obwohl der Signalweg von *columbus* zu diesem Faktor nicht bekannt ist, wird ein Mevalonat-Derivat als „attractant“ diskutiert (Howard, 1998).

#### **1.4 Entstehung des embryonalen Muskelmusters**

Die somatische Bewegungsmuskulatur der *Drosophila*-Larve besteht aus einer erstaunlich diversen Population von dreißig unterschiedlichen Myotuben in jedem Hemisegment der

Körperwand. Die somatische Muskulatur gliedert sich in eine interne, intermediäre und externe Lage von Muskeln. Das stereotype Muskelmuster setzt sich aus dorsal, lateral und ventral gelegenen Muskeln zusammen. Diese sind entweder anterior-posterior (longitudinale Muskeln), schräg (acute bzw. oblique Muskeln) oder dorsal-ventral (transversale Muskeln) ausgerichtet (Bate, 1993; Abb. 1-5). Diese Körperwandmuskeln sind synzytiale Fasern, die durch die Fusion von embryonalen Myoblasten gebildet werden. Alle Myotuben besitzen eine einzigartige Charakteristik, die durch ihre Größe, Form, Anheftungsstelle an der Epidermis und Innervation von Motoneuronen definiert ist (Bate, 1993).

Genetische Studien bei *Drosophila* ergaben wichtige Einblicke in die Signalübertragungswege, welche die Aufbau- und Differenzierungsprozesse der Körperwandmuskulatur steuern. Diese Signalwege kontrollieren die schrittweise Unterteilung des Mesoderms, die letztlich zur Differenzierung von individuellen Zellen führt, den Muskelgründerzellen (Übersicht: Baylies und Michelson, 2001). Diese sind mit genetischen Programmen ausgestattet, die sie befähigen verschiedene Muskelfasern zu bilden. Es zeichnet sich ein Netzwerk von unterschiedlichen Aktivitäten über Transkriptions-Regulatoren, Signaltransduktionskaskaden und „lineage“-Genen ab, welches die aufeinander folgenden Schritte der Muskelmusterbildung und Differenzierung steuert (Übersicht: Frasch, 1999).

#### Schema

*in vivo*

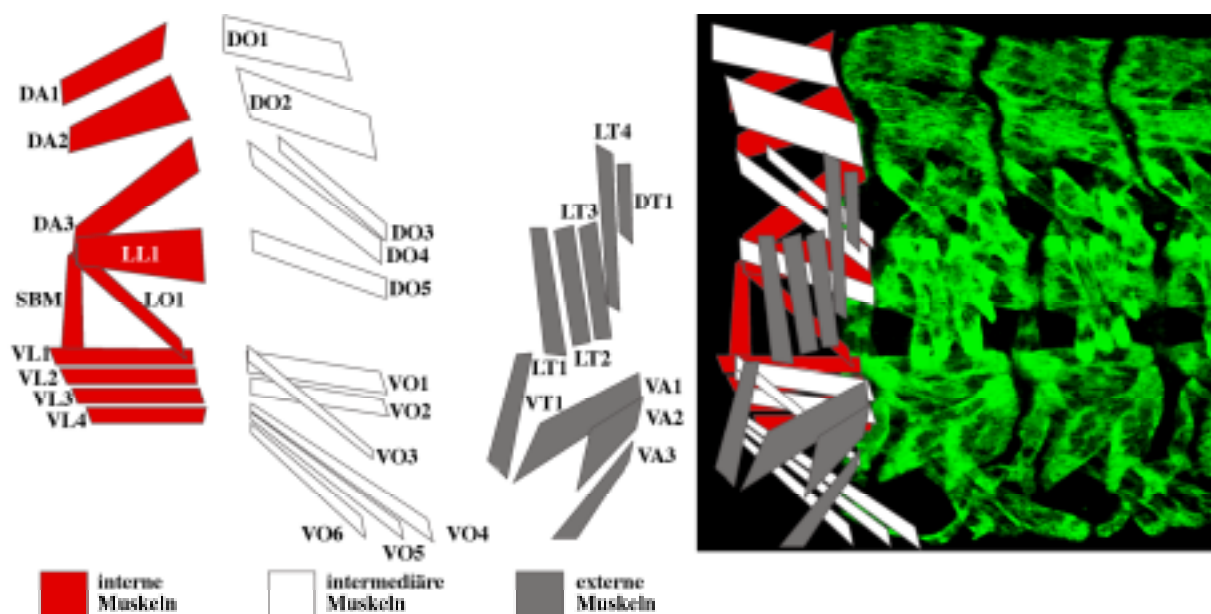


Abb. 1-5: Darstellung der somatischen Muskulatur eines Abdominalsegments (A2-A7)

Abkürzungen: **DA** dorsal-„acute“, **DO** dorsal-„oblique“, **DT** dorsal-transversal, **LL** lateral-longitudinal, **LO** lateral-„oblique“, **LT** lateral-transversal, **VL** ventral-longitudinal, **VO** ventral-„oblique“, **SBM** „segment border muscle“  
(anterior ist links, dorsal ist oben)

In den vergangenen Jahren haben genetische Untersuchungen Prozesse aufgedeckt, die undeterminierte mesodermale Zellen durchlaufen müssen, um sich zu bestimmten Körpermuskeln zu entwickeln. Diese Vorgänge umfassen: die Festlegung des somatischen Muskelschicksals, den Erwerb der spezifischen Muskelkompetenz innerhalb einer Gruppe von äquivalenten Zellen, die Determinierung der einzelnen Muskelvorläuferzellen in dieser Äquivalenz-Gruppe, die asymmetrische Teilung der Vorläuferzellen in zwei Gründerzellen, die die Bildung individueller Muskeln zur Folge hat, die Fusion der Muskelgründerzellen mit undifferenzierten fusionskompetenten Myoblasten, welche zur Ausbildung von fertig ausdifferenzierten Muskeln führt und schließlich das gerichtete Wachstum der Muskelfasern und ihr Anschluss an die Apodeme (Abb. 1-6).

### **1.4.1 Frühe Unterteilung des Mesoderms**

Kurz nach der Gastrulation erfolgt die Untergliederung des Stamm-Mesoderms und die Ausbildung von bestimmten Zellarealen, die die Kompetenz zur Bildung der somatischen Muskeln besitzen. Zunächst findet eine segmentale Unterteilung des Mesoderms entlang der anterior-posterioren Achse statt (Dunin-Borkowski et al., 1995; Azpiazu et al., 1996). Zwei alternierende Zellstreifen unterteilen die metameren Parasegmente des Ektoderms. Der Hauptteil der späteren Körperwandmuskulatur geht aus den mesodermalen Zellstreifen hervor, die im posterioren Teil eines Parasegments liegen und *sloppy paired* (*slp*) exprimieren. Aus dem im anterioren Anteil liegenden Zellstreifen, der *even skipped*-Expressionsdomäne, gehen die viszerale Muskeln und der Fettkörper hervor (Riechmann et al., 1997). Der Mechanismus der Mesoderm-Unterteilung ist eng mit der Segmentierung des Ektoderms verbunden. In diesem Prozess spielen Paar-Regel-Gene und Segment-Polaritäts-Gene eine wichtige Rolle. Für die Etablierung der posterioren Domänen sind die Aktivitäten des *wingless*- (*wg*) und des *sloppy paired*-Gens notwendig (Azpiazu et al., 1996). In Abwesenheit dieser Genaktivitäten unterbleibt die Bildung der somatischen Muskulatur fast vollständig (Riechmann et al., 1997). Vermutlich führt die *wg*- und *slp*-Expression zu einer Aktivierung von Genen in der anterioren mesodermalen Domäne. Ein Kandidat für ein derart aktiviertes Gen ist *twist* (*twi*) (Thisse et al., 1987), das zusammen mit *slp* und *wg* die Kompetenz der anterioren Zelldomäne zur Ausbildung von somatischen Muskeln festlegt (Baylies und Bate, 1996).

### **1.4.2 Aufbau des frühen Muskelmusters**

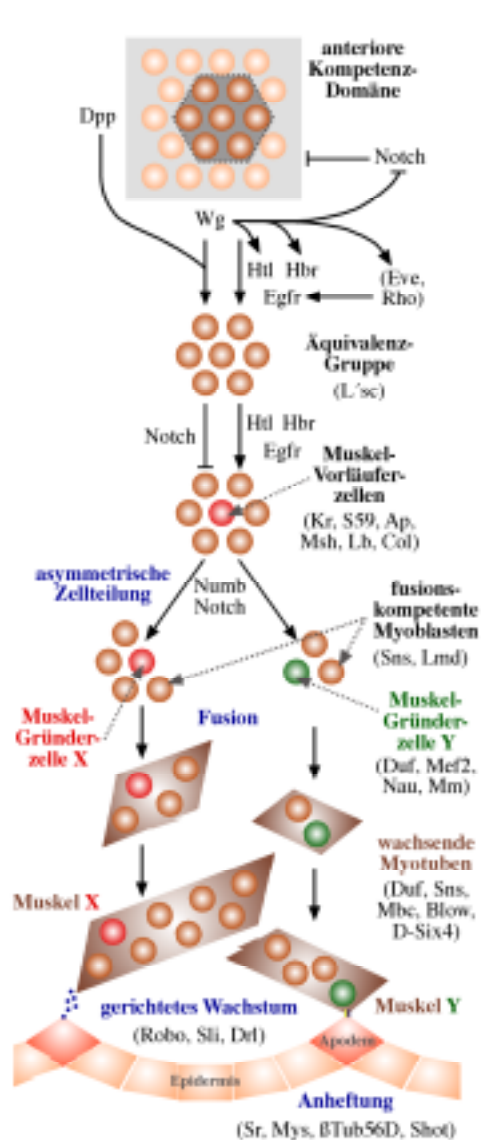
Die sogenannten Muskelvorläuferzellen stammen ausschließlich aus den posterioren Domänen. Sie gehören zu den ersten Zellen die eine Determination zur Bildung von somatischer Muskulatur erfahren. Die Festlegung einer bestimmten Muskelidentität wird auch

durch eine räumlich strikt begrenzte kombinatorische Expression von Genen in definierten Muskelvorläufergruppen belegt (Ruiz-Gómez et al., 1997; Knirr et al., 1999). Beispiele für solche selektiv exprimierten Gene sind: *S59 (slouch)*, *apterous (ap)*, *ladybird (lb)*, *Krüppel (Kr)*, *muscle segment homeobox (msh)*, *collier (col)* und *nautilus (nau)* (Bourgouin et al., 1992; Lord et al., 1995; D'Alesio und Frasch, 1996; Jagla et al., 1998; Crozatier und Vincent, 1999; Paterson et al., 1991). Aufgrund ihrer Expression in bestimmten Muskelvorläufern, Muskelgründerzellen und fertigen somatischen Muskeln, und ihrer mutmaßlichen Rolle bei der Determinierung von Muskelzellschicksalen, werden sie auch als Muskel-Identitäts-Gene bezeichnet (Übersicht: Frasch, 1999). Einige dieser Gene besitzen redundante Funktionen in bestimmten Muskelgruppen, sind aber essenziell für die Entwicklung anderer Gruppen (Nose et al., 1998; Knirr et al., 1999). Die überlappende Expression von unterschiedlichen Muskel-Identitäts-Genen in verschiedenen Muskelvorläuferzellen bzw. Muskelgründerzellen und funktionellen Analysen dieser Gene sind weitere Indizien für die Richtigkeit der Gründerzellen-Hypothese (Bate, 1990).

### **1.4.3 Signalübertragungsvorgänge**

Das stereotypisch angeordnete Muster und die Vielfalt von Muskelvorläuferzellen impliziert, dass bei der Bildung dieser komplexen Struktur, neben der segmentalen Unterteilung zusätzlich aktive Signalisierungsmechanismen involviert sind. Dies umfasst sowohl Signalisierungsvorgänge zwischen einzelnen mesodermalen Zellen, als auch zwischen dem Ektoderm und dem Mesoderm. Die Musterbildungsprozesse die zur Bildung der Muskeldiversität führen sind nur in wenigen Muskeln detailliert untersucht. Die Entwicklungsvorgänge zweier Muskelvorläuferzellen (P2 und P15) im dorsalen Mesoderm sind eingehend erforscht worden (Carmena et al., 1998; Knirr und Frasch, 2001). Durch das Zusammenwirken im Ektoderm von transversalen Zellstreifen mit *wingless (wg)*-Aktivität und dorsaler *decapentaplegic (dpp)*-Signaltransduktion, wird das Schicksal von dorsalen mesodermalen Zellen bestimmt (Park et al., 1998; Übersicht: Wilson, 1999). Die in der Schnittfläche liegenden Zellen im Mesoderm werden sich später zu somatischen Muskeln entwickeln. Wingless (Wg) in Kombination mit Decapentaplegic (Dpp) generiert eine mesodermale Unterdomäne, die kompetent ist, auf induktive Signale mittels Heartless (Htl) und Epidermal growth factor receptor (Egfr) zu antworten. Dpp wirkt in diesem Prozess zusammen mit Tinmann (Tin) und führt zur Aktivierung von *lethal of scute (l'sc)* in diesen Domänen. Eine Begrenzung dieser *l'sc*-Expression auf kleinere Bereiche wird durch *heartless (htl)*-Aktivität hervorgerufen (Carmena et al., 1998). Die Rolle von *l'sc* während der Muskelbildung gleicht der Aufgabe des *achaete-scute*-Gens bei der neuronalen Entwicklung. Zusammen mit *wg* und *dpp / tin* bewirkt die *heartless*-Signaltransduktion die Aktivierung des Muskel-Identitäts-Gens *even skipped (eve)* in Zellen eines promuskulären „clusters“. Die *eve*-

Expression wird wiederum mittels lateraler Inhibition von *MAPK* (*rolled*), durch *Notch* (*N*), auf einzelne Zellen begrenzt (Übersicht: Frasch, 1999). Die asymmetrische Segregation von Numb, einem negativen Regulator der Notch-Signaltransduktion, ermöglicht die Expression von bestimmten Muskel-Identitäts-Genen und eine damit verbundene Bildung von verschiedenen Muskelgründerzellen (Lu et al., 1998).



**Abb. 1-6: Regulatorische Prozesse bei der Muskel-Spezifizierung, -Fusion, -Wachstum und -Anheftung**

Das Potential von frühen mesodermalen Zellen zur Muskelbildung wird von Notch (N) reprimiert. Wingless (Wg) in Kombination mit Decapentaplegic (Dpp) generiert eine mesodermale Unterdomäne, die kompetent ist auf induktive Signale, mittels Heartless (Htl) und Epidermal growth factor receptor (Egfr), zu antworten. Heartbroken (Hbr) ist ein Htl-spezifischer Signal-Überträger. Even skipped (Eve) ist ein Muskel-Identitäts-Faktor im promuskulären Cluster. Rhomboid (Rho) ist eine proximale Komponente der Egfr-Signalübertragung. Die Rolle von Lethal of scute (L'sc) während der Muskelbildung gleicht der Aufgabe des *achaete-scute*-Gens bei der neuronalen Entwicklung. Die asymmetrische Segregation von Numb, einem negativen Regulator der Notch-Signaltransduktion, ermöglicht die Bildung verschiedener Muskelgründerzellen. S59 (Slouch), Apterous (Ap), Muscle segment homeobox (Msh), Ladybird (Lb), Krüppel (Kr) und Collier (Col) sind sogenannte Muskel-Identitäts-Gene und determinieren das Muskelzellschicksal. Die Fusion von Muskel-Gründerzellen mit fusionskompetenten Myoblasten erfordert anziehende Faktoren wie: Dumbfounded (Duf), Sticks-and-stones (Sns) und den Regulator Lane duck (Lmd). Die Muskel-Differenzierungs-Faktoren: Myocyte enhancing factor 2 (Mef2), Mindmelt (Mm), und das regulatorische Protein Nautilus (Nau) spielen bei Fusions- und Differenzierungsprozessen eine Rolle. Die wachsenden Myotuben benötigen zur exakten Verschmelzung zu fertigen Muskelfasern die Proteine: Myoblast city (Mbc), Blown fuse (Blow) und D-Six4. Für das gerichtete Wachstum der Muskeln sind die Proteine Slit (Sli), Roundabout (Robo) und Derailed (Drl) notwendig. Bei der Anheftung der Muskeln an die Epidermis sind Stripe (Sr), Myospheroid (Mys),  $\beta$ 1-Tubulin ( $\beta$ Tub56D) und Short stop (Shot) involviert.

#### 1.4.4 Prozesse der Muskelmusterbildung und Muskeldifferenzierung

Die kombinatorische Expression der Muskel-Identitäts-Gene determiniert muskelspezifische Differenzierungsvorgänge, wie z.B. die Fusion zu Synzytien festgelegter Größe (Myotuben), die Anheftung an definierte epidermale Stellen und eine spezifische Innervation von Muskeln. Die Fusion von Vorläuferzellen zu multinuklearen Muskelfasern wird durch die Aktivierung bzw. Aufrechterhaltung von sogenannten Muskeldifferenzierungsfaktoren erreicht. *Mef2* (Myocyte enhancing factor 2) (Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995) und *muscleblind* (*mindmelt*

/ *mm*) (Artero et al., 1998) sind Vertreter dieser Art von Genen. Für die Differenzierung von spezifischen Muskeln sind zusätzlich regulatorische Gene wie *nautilus (nau)* notwendig (Balagopalan et al., 2001).

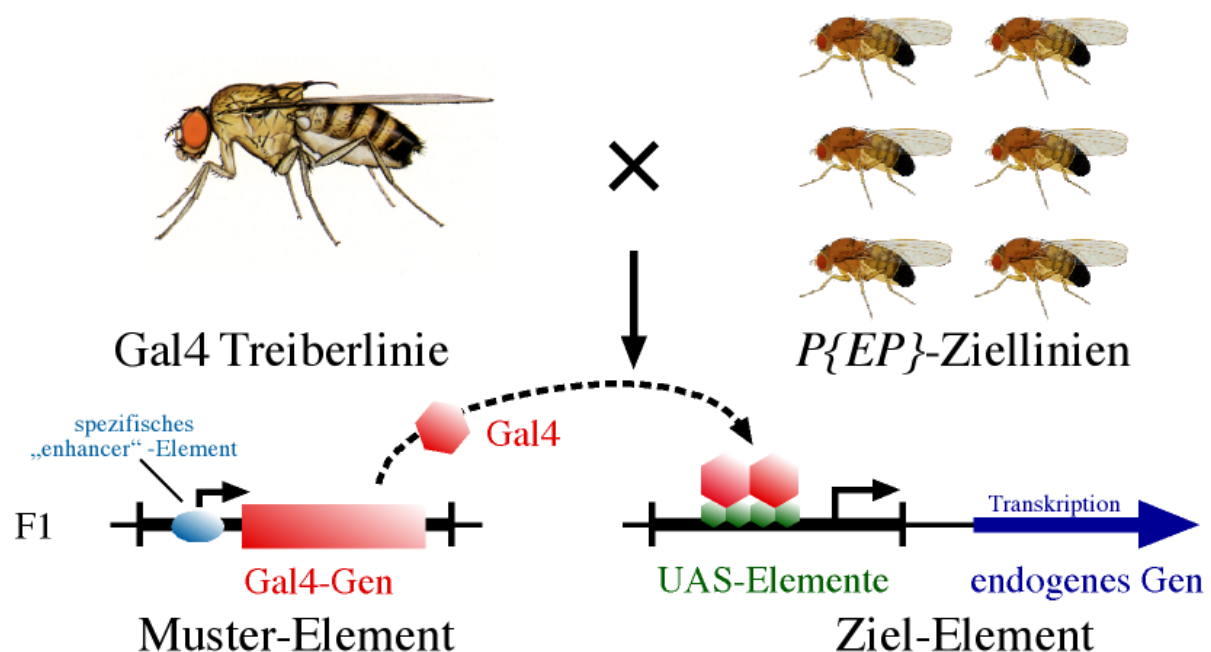
Die Gründerzellen fusionieren im Laufe des Keimstreifrückzugs mit fusionskompetenten Myoblasten (Bate, 1990; Paululat et al., 1999). Zwei Gene, die für diesen Fusionsprozess wichtig sind, werden im Folgenden vorgestellt. Die Gründerzellen exprimieren ein spezifisches Ig-Domänen-Protein: Dumbfounded (*Duf*). Dieses wirkt als „attractant“ für fusionskompetente Myoblasten (Ruiz-Gómez et al., 2000). Die fusionskompetenten Zellen exprimieren dagegen ein zweites Ig-Domänen-Protein: Sticks-and-stones (*Sns*). Das *sticks-and-stone-(sns)*-Gen spielt eine Rolle bei der Erkennung der fusionskompetenten Myoblasten mit den Gründerzellen und bei der Initiierung ihrer Fusion zu Myotuben (Bour et al., 2000).

Die gebildeten synzytialen Myotuben wachsen gerichtet entlang der inneren Seite der Epidermis in Richtung ihrer zukünftigen epidermalen Anheftungsstellen, den Apodemen. An den Enden der sich entwickelnden Myotuben bilden sich Filopodien aus (Bate, 1990). Diese Zellfortsätze dienen der Findung der epidermalen Muskelanheftungsstellen (Bate, 1990). Bislang konnten jedoch nur wenige extrazelluläre Moleküle identifiziert werden, die eine Rolle bei der Führung der Myotuben spielen. Beispiele dafür sind das Ligand / Rezeptor-Paar Slit / Roundabout (Kidd et al., 1998; Kidd et al., 1999) und die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Derailed (Callahan et al., 1996). In *slit*-Mutanten wird eine Muskelfasergruppe nicht mehr von der adäquaten Anheftungsstelle angezogen. Eine Überexpression des Robo-Rezeptors in einem Teil der Myotuben hingegen, veranlasst diese nur Apodeme mit hohem Slit-Niveau anzusteuern (Kramer et al., 2001). Mutationen, die das *derailed*-Gen betreffen, bewirken ebenfalls eine gestörte Zielfindung von einigen Myotuben zu den epidermalen Anheftungsstellen (Callahan et al., 1996).

Das *stripe*-Gen (*sr*) (Frommer et al., 1996) kodiert für einen Transkriptionsaktivator und wirkt als „Schaltergen“ für die Entwicklungsprozesse der epidermalen Muskelanheftungszellen (Apodeme). Seine Aktivität leitet in Epidermiszellen ein Entwicklungsprogramm zur Differenzierung zu Apodemen ein, und kontrolliert die Expression von Apodem-spezifischen Genen. Diese Zellen senden vermutlich „long range“-wirkende Signalmoleküle aus, die das Wachstum der Myotuben steuern und deren spätere Anheftung an die Epidermis bewirken (Vorbrüggen und Jäckle, 1997). In „loss-of-function“- und „gain-of-function“-Experimenten mithilfe des *stripe*-Transkriptionsfaktors, konnte gezeigt werden, dass *stripe*-Aktivität notwendig ist, um ektodermale Zellen in Apodemvorläuferzellen umzuwandeln. Um Migrationsprozesse auf molekularer und zellulärer Ebene zu untersuchen, wählten wir diesen definierten Vorgang des gerichteten Wachstums der Muskelzellen zu ihren epidermalen Anheftungsstellen als Modellsystem (1.5).

## 1.5 Fehlexpressions-, „Screen“

Die Durchmusterung bzw. Manipulation des Genoms von *Drosophila melanogaster* ist ein effizienter Weg zur Analyse komplexer biologischer Prozesse. Solche „genetischen Screens“ führten zur Identifizierung von vielen Genen, die bei der Musterbildung und Signaltransduktion der Taufliege involviert sind. Ein prinzipieller Vorteil dieser „Screens“ ist die Möglichkeit der Analyse von Genfunktionen in spezifischen Vorgängen ohne Kenntniss ihrer Identität bzw. molekularen Natur. In konventionellen „Screens“ wurden Chemikalien oder ionisierende Strahlung benutzt, um Gene statistisch zu mutagenisieren (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Transposable Elemente bieten zusätzlich zu ihren mutagenen Eigenschaften die Möglichkeit einer einfachen Identifizierung der betroffenen Gene (Spradling et al., 1995). Die genannten Mutagene bewirken normalerweise eine Reduktion oder Eliminierung der Genfunktion („loss-of-function“). Dahingegen können sogenannte „gain-of-function“-Mutationen die Aktivität von Genen verändern bzw. verstärken. Es wird geschätzt, dass etwa zweidrittel aller *Drosophila*-Gene nach einer Mutation zu keinem offensichtlichen „loss-of-function“-Phänotyp führen (Miklos und Rubin, 1996), z.B. wegen einer funktionellen Redundanz dieser Gene. Über- bzw. Fehlexpressions-, „Screens“ liefern jedoch die Möglichkeit die Funktion auch solcher Gene zu untersuchen.



**Abb. 1-7: Schematische Darstellung: modularer Fehlexpressions-, „Screen“**

Eine gewebespezifische Treiberlinie wird mit einer großen Anzahl unabhängiger Ziellinien gekreuzt. In den Nachkommen, welche sowohl das Muster-Element, als auch das Ziel-Element besitzen, kann das Gal4-Protein an die UAS-Elemente binden und eine Aktivierung des angrenzenden, endogenen Gens bewirken. Jedes der unabhängigen Ziel-Elemente betrifft somit ein individuelles, endogenes Gen und dessen Expression.

Um einen systematischen Fehlexpressions-„Screen“ in *Drosophila* zu ermöglichen entwickelte Pernille Rørth ein modulares System, das *P*-Element-Insertions-Mutagenese und Gal4-gesteuerte Genexpression (Brand und Perrimon, 1993) verbindet. Um neue Bestandteile der genetisch zugrundeliegenden Schaltkreise der Steuerung der gerichteten Zellmigration zu charakterisieren, verwendeten wir diese UAS/Gal4-vermittelte Fehlexpression von Genen mit zufallsbedingter *P*-Element-Insertion (Rørth, 1996; Rørth et al., 1998; **Abb. 1-7**). Diese Fehlexpression von endogenen Genen wurde, mithilfe gewebespezifischer Treiber, in den segmentalen Apodemvorläuferzellen und in einer zwischenliegenden Reihe ektodermaler Zellen verursacht (**2.1**). Wir führten diesen Fehlexpressions-„Screen“ in einem großen Maßstab durch, um Gene zu identifizieren, welche das gerichtete Auswachsen der Myotuben und die Anheftung der Muskeln an die Epidermis regulieren.

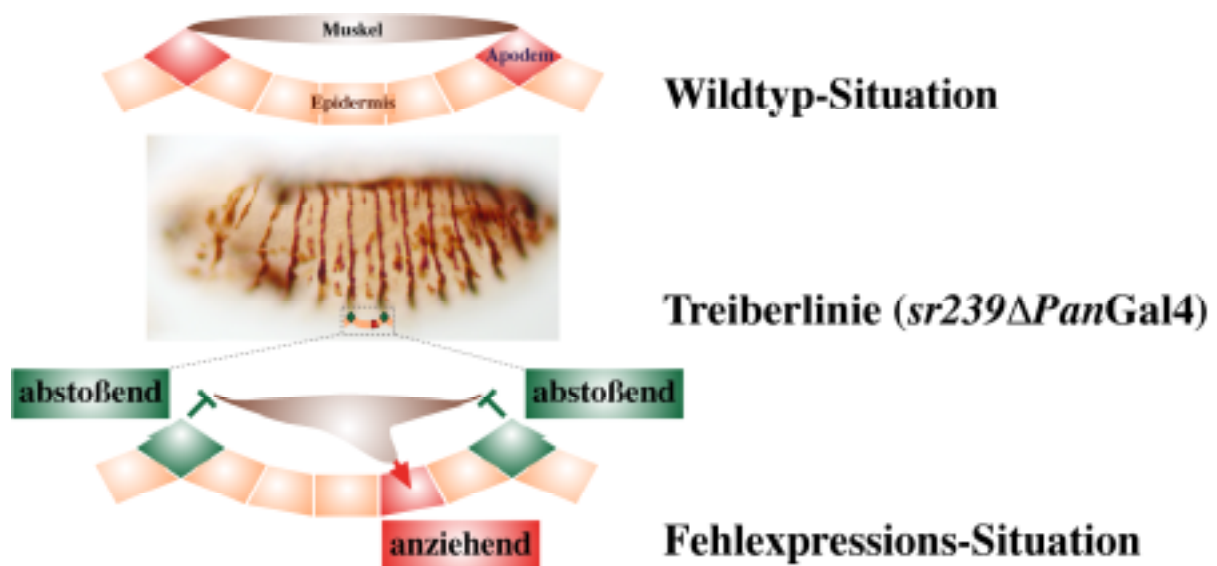
Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung neuer Genaktivitäten, die bei der Tauflye *Drosophila melanogaster* an der Steuerung von gerichteten Wanderungsprozessen beteiligt sind. Dabei diente die Entwicklung der Körperwandmuskulatur des *Drosophila*-Embryos als Modell, da bei diesem System die Wegfindung der Muskelvorläuferzellen vermutlich durch die Interaktion von lediglich zwei Zelltypen gesteuert wird: den Muskelgründerzellen und den epidermalen Muskelbindungszellen (Übersicht: Volk, 1999). Ein weiterer Vorteil dieses Systems liegt in der Tatsache, dass bereits kleine Veränderungen der Körperwandmuskulatur zu embryonaler bzw. larvaler Letalität führen. Das besondere Interesse bei diesem „Screen“ lag auf der Identifizierung von Genaktivitäten, die das gerichtete Auswachsen der Muskelvorläufer regulieren. Die Ergebnisse der jüngsten Vergangenheit (Forbes und Lehmann, 1999; Deshpande et al., 2001; Kirby et al., 2001) deuten darauf hin, dass viele regulatorische Mechanismen und Faktoren bei gerichteten Wachstumsprozessen in verschiedenen Geweben mehrfach verwendet werden. Somit sollte mit diesem „Screen“ auch die Identifikation von Genaktivitäten möglich sein, die eine Funktion bei der Kontrolle von anderen gerichteten Wachstums- bzw. Migrationsprozessen haben.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 Fehlexpressions-„Screen“ zur Erzeugung von letalen Muskelphänotypen

Die Basis der von uns gewählten Mutagenesestrategie bildet der *P*-Element-Vektor *P{EP}* (Rørth, 1996), der die Gal4-abhängige Expression von zum *P*-Element benachbarten Transkriptionseinheiten ermöglicht. Zu diesem Zweck enthält der Vektor vor einem basalen Promotor 14 Kopien eines UAS-Elements, an die der Transkriptionsfaktor Gal4 aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) jeweils binden kann. Die Gal4-induzierte RNA-Transkription am 3'-Ende des *P{EP}*-Elements läuft in den benachbarten genomischen Bereich hinein und ermöglicht so die Synthese der „sense“- bzw. „antisense“-RNA des zum *P{EP}*-Element benachbarten Gens, bzw. von Teilbereichen des Gens (Abb. 1-7). Der *P{EP}*-Element-Vektor enthält außer dem Promotor eine selektionierbare Markermutation in Form des *white*-Allels *w<sup>+</sup>m<sup>C</sup>* (Übersicht: Pirrotta, 1988), dessen Aktivität zur Identifizierung der transgenen Fliegenlinien dient. Ferner enthält das *P{EP}*-Element einen „*origin of replication*“ und ein Kanamyzin-Resistenzgen, die die *P*-Element abhängige Klonierung von genomischen DNA-Fragmenten, die benachbart zur Integrationsstelle des *P{EP}*-Element-Vektors liegen, ermöglichen. Die entsprechende Methode wird im Folgenden als „plasmid rescue“ bezeichnet (Perucho et al, 1980).



**Abb. 2-1: Treiberlinie: *sr239ΔPanGal4* (Muster-Element)**

Die Fehlexpression wurde in den segmentalen Apodemvorläuferzellen und in einer Reihe zwischenliegender, epidermaler Zellen aktiviert. Auf diese Weise sollten abstoßende Faktoren an der Segmentgrenze bzw. anziehende Signale, welche die Muskeln zu den intrasegmentalen Zellen fehlleiten, identifiziert werden. Eine Störung des Muskelmusters, die Letalität zur Folge hat, kann in beiden Fällen erwartet werden. Als Beispiel ist hier die Treiberlinie *sr239ΔPanGal4* (Muster-Element) dargestellt. Sie wurde mit dem UAS-LacZ Ziel-Element gekreuzt. Die Transaktivierung wurde mithilfe einer antiβGal-Antikörperfärbung visualisiert.

Als Gal4-Treiberlinie wurde der *sr239ΔPan*Gal4-Fliegenstamm genutzt. Sie führt, auf der Basis des *sr239ΔPan*-Promotorfragments des *stripe*-Gens (Piepenburg et al., 2000), zur Aktivität des Gal4-Proteins in einem Zellstreifen an der Segmentgrenze und in einem parallelen Teilstreifen innerhalb des Segmentes. Dadurch entstehen zusätzlich zum normalen *stripe*-Expressionsmuster (Streifenlage: posterior zur *engrailed*-Expressionsdomäne) Zwischenstreifen, die anterior zur *engrailed*-Domäne liegen. Die in den Segmentgrenzen liegenden Apodemvorläuferzellen spielen für das gerichtete Wachstum der Muskelvorläufer eine wichtige Rolle (Übersicht: Volk, 1999). Die Fehlexpression bzw. Überexpression von Genen in diesen Zellen sollte die Identifizierung von Faktoren erlauben, die direkt oder indirekt mit dem gerichteten Auswachsen der Muskelvorläuferzellen interferieren, z.B. abstoßend wirkende Genaktivitäten. Die Expression in den Zellen des intrasegmentalen Streifens, welche normalerweise nicht das Muskelwachstum beeinflussen, erlaubt analog die Identifizierung von auf das Muskelwachstum anziehend wirkenden Faktoren (Abb. 2-1). In beiden Fällen sollte die anomale Wachstumskontrolle zu einer veränderten Muskulatur führen. Dies hätte zur Folge, dass Larven, die beim Schlüpfvorgang auf eine intakte Muskulatur angewiesen sind, in der Eihülle absterben. Zur Unterscheidung von anziehenden („attractive“) bzw. abstoßenden („repulsive“) Faktoren wurde eine zweite Gal4-Treiberlinie (*sr239Gal4*) verwendet. Dieser Treiber vermittelt die Gal4-Expression nur in der posterior zur *engrailed*-Domäne liegenden Reihe von epidermalen Zellen und zeigt somit das normale *stripe*-Expressionsmuster (Piepenburg et al., 2000). Eine ektopische Überexpression an dieser segmentalen Grenze sollte nur im Falle eines Muskel-abstoßenden Faktors zur Störung des Muskelmusters führen.

Für den Fehlexpressions-„Screen“ (1.5) wurden ca. 2.000 publizierte *P{EP}*-Insertionslinien (Rørth, 1996) sowie 2.000 neue Linien (Pernille Rørth, unpubliziert) verwendet. Zur Auswertung dieser Kreuzungen wurden potenzielle Kandidaten in einer Wiederholungsrunde mit dem *sr239ΔPan*Gal4-Treiber gekreuzt, um die Nachkommenschaft erneut auf Letalität hin zu überprüfen. Die Linien, in denen auch bei dieser Wiederholungskreuzung die UAS / Gal4-getriebene Expression Letalität erzeugte, wurden phänotypisch näher begutachtet. Zu diesem Zweck wurde die embryonale Körperwandmuskulatur nach Antikörperfärbung mit einem anti-Myosin-Heavy-Chain (MHC) Antiserum (freundlicherweise erhalten von D. P. Kiehart) untersucht. In den Fällen, bei denen die ektopische Expression Defekte des räumlichen Muskelmusters induziert hatte, wurde versucht, die beteiligte Genaktivität mittels „plasmid rescue“ (4.1.10) oder inverser PCR (4.1.11) molekular zu identifizieren.

## 2.2 Kandidaten-Linien, die zur Letalität im Fehlexpressions-„Screen“ führten

Die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse des Fehlexpressions-„Screens“ sind eine Gemeinschaftsleistung, die in Zusammenarbeit mit Nicole Staudt und Gerd Vorbrüggen

erbracht wurde. In diesem „Screen“ wurden Jungfrauen der *sr239ΔPanGal4*-Treiberlinie mit männlichen Fliegen von insgesamt 4.000 unabhängigen *P{EP}*-Linien (Rørth, 1996 & Rørth unpubliziert) gekreuzt. Bei 70 (1,75%) dieser Linien verursachte die Gal4-induzierte Fehlexpression Letalität in der Nachkommenschaft. Bei 50 (1,25%) dieser Linien führte die Fehlexpression des *P{EP}*-Elements zu einer Störung des Musters der embryonalen Körperwandmuskulatur. Mittels „plasmid rescue“ (4.1.10) bzw. inverser PCR (4.1.11) wurden jene genomischen Bereiche kloniert, die in unmittelbarer Nachbarschaft zur *P{EP}*-Insertion liegen, und anschließend sequenziert. Durch Vergleich mit der Sequenz des Genoms von *Drosophila* (Adams et al., 2000; Myers et al., 2000) konnten potenzielle Kandidaten-Gene identifiziert werden, deren Fehlexpression zu möglichen Änderungen in den Migrationsprozessen führt. Nachfolgend sind die 70 Kandidaten-Linien, die zugeordneten Kandidaten-Gene, ihre Lokalisation und molekulare Informationen zu den Genen aufgelistet (Tabelle 2-A). Drei Kandidaten-Linien, die aufgrund der in (2.2.2) erläuterten Kriterien ausgewählt wurden, werden nachfolgend beispielhaft vorgestellt. Dann folgt eine detaillierte Untersuchung einer *P{EP}*-Insertionslinie 36553 und dem von ihr betroffenen, annotierten Gen *CG14648* (2.5).

### 2.2.1 Zusammenfassung der Kandidaten aus dem Fehlexpressions-„Screen“

Gen	<i>P{EP}</i>	Lokalisierung	molekulare Information
<b>Zellzyklus und Zellteilung</b>			
<i>twe</i>	(2)0613	35 F1-2	<i>twine</i> (cdc25 Homolog)
<i>CG10685</i>	26450	37 C1-3	(RNA-Polymerase I)
<i>CycB3</i>	(3)3127	96 B4-5	<i>cyclin B3</i> (Mitose)
<i>CycA</i>	30838	68 D3-4	<i>Cyclin A</i> (Mitose)
<b>Enzyme / Biosynthese</b>			
<i>BcDNA:GH02901</i>	10906	13 A3-5	(Acyl-CoA-Synthetase)
<i>Parg</i>	10914	3 F1-2	<i>Poly(ADP-ribose) glycohydrolase</i>
<i>GstS1</i>	(2)1074	53 F11	<i>Glutathione S transferase S1</i>
<i>*ifc</i>	(2)2092	26 A9-B1	<i>infertile crescent</i> (Stearoyl-CoA Desaturase)
<i>guf</i>	(2)2104	48 E12-F1	<i>gutfeeling</i> (Ornithin-Decarboxylase-Inhibitor)
<i>CG17292</i>	(2)2392	29 B2-4	Triacylglycerol-Lipase
<i>CG15078</i>	(2)2470	55 E11—F1	Kalzium / Lipid-bindende Domäne (C2)
<i>*ifc</i>	20692	26 A9-B1	<i>infertile crescent</i> (Stearoyl-CoA Desaturase)
<i>LysC</i>	35048	61 F3	<i>Lysozyme C</i>
<i>CG6854</i>	35098	71 B1-2	CTP-Synthase
<i>Mocs1</i>	35125	68 A3	<i>Molybdenum cofactor synthesis-step 1 protein A</i>

Gen	P{EP}	Lokalisierung	molekulare Information
<b>Enzyme / Biosynthese</b>			
<i>sfl</i>	35161	65 B2-4	<i>sulfateless</i> (Heparin N-Deazetylase)
<i>CG12171</i>	35180	83 B5-6	(Insekt-Alkoholdehydrogenase)
<b>CG14648</b>	<b>36553</b>	<b>82 B1-2</b>	<b><i>aeneas</i> (Enzym-Domäne)</b>
<b>Kinasen</b>			
<i>Pka-C1</i>	(2)2160	30 C6-7	<i>cAMP-dependent protein kinase 1</i>
<i>Adk1</i>	32155	68 F7-69 A1	<i>Adenylate kinase-1</i>
<i>CG10535</i>	35141	86 E18-20	IκB-Kinase (NFκB-Signaltransduktion )
<i>CG9287</i>	36698	29 E2-3	Ethanolamin-Kinase
<b>Protein-Transport</b>			
<i>chic</i>	25871	26 A9-B1	<i>chickadee</i> ( <i>profilin</i> – zytoplasmatischer Transport)
<i>Gl</i>	(3)3024	70 C6	<i>Glued</i> (Mikrotubuli-Motorprotein)
<i>CG11857</i>	32235	96 C4-6	(Vesikeltransport)
<b>Protein-Degradierung</b>			
<i>Uba1</i>	25812	46 A1-3	<i>ubiquitin-activating enzyme 1</i>
<i>eff</i>	32278	88 D2-3	<i>effete</i> (Ubiquitin-konjugierendes-Enzym)
<i>HERC2</i>	35124	19 D1-2	(Ubiquitin-Proteinligase)
<i>CG11033</i>	(3)3093	85 C9-11	(„F box like“ Protein)
<i>CG5555</i>	(3)3186	91 F5-7	RING-Finger Domäne
<b>Carrier</b>			
<i>rdgBbeta</i>	(2)2360	12 B8	<i>retinal degeneration B</i> (P-Inositol-Transporter)
<i>CG11665</i>	(2)2646	41 F9	(Monocarboxylat-Carrier)
<i>CG4963</i>	35059	98 B2-3	(mitochondrialer „solute carrier“)
<b>Transkriptions Regulatoren</b>			
<i>CG12701</i>	(X)1344	18 F1-2	Zn-Finger
<i>bbx</i>	10912	19 F2	(Transkriptionsfaktor)
<i>esg</i>	(2)2159	35 D1-2	<i>escargot</i> (RNA-Polymerase II Transkriptionsfaktor)
<i>shn</i>	25866	47 D5-7	<i>schnurri</i> (Zn-Finger Transkriptionsfaktor)
<i>ftz-f1</i>	(3)0447	75 D4-6	<i>ftz transcription factor 1</i> (Orphan Kern-Rezeptor)
<b>RNA-bindene Proteine</b>			
<i>CG8920</i>	25585	56 F14	TUDOR-Motiv
<i>B52</i>	35047	87 F7-8	mRNA Splicing Faktor

Gen	P{EP}	Lokalisierung	molekulare Information
<b>Plasmamembranproteine / Rezeptoren</b>			
<i>pcx</i>	(X)1460	2 E2-F1	<i>pecanex</i> (Plasmamembranprotein)
<i>Tsp42Ej</i>	(2)2425	27 E3-4	<i>Tetraspanin 42 Ej</i> (Membranprotein)
<i>Tsp42Ee</i>	20290	42 D6-E1	<i>Tetraspanin 42Ee</i> (Membranprotein)
<i>Sdc</i>	21140	57 D11-E6	<i>Syndecan</i> (Heparansulfat, Zelladhäsion)
* <i>GNBP3</i>	32189	66 E4-5	<i>Gram-negative bacteria binding protein 3</i>
<i>pyd</i>	35117	85 B4-5	<i>polychaetoid</i> (MAGUK)
<i>Tl</i>	36772	97 D1-2	<i>Toll</i> (Rezeptor, Zelladhäsion)
* <i>GNBP3</i>	37027	66 E4-5	Rezeptor, NFκB-Signaltransduktion
<b>Diverse</b>			
<i>CG3692</i>	(X)1073	14 B11-14	(calpain-ähnlich Zytoskelett-Umbau)
<i>CG1733</i>	(X)1218	12 A1-2	-
<i>CG3600</i>	(X)1232	2 B16-18	EG:BACH61I5.1+
<i>kat-80</i>	(X)1319	14 B11-12	<i>katanin-80</i> (Mikrotubuli-abbauendes Protein)
<i>CG9742</i>	10913	14 F4-5	(kleines Kern-Ribonukleoprotein)
<i>CG8675</i>	10919	15 F1	(Cystein-reiche Domäne)
<i>CG8443</i>	(2)0969	52 F6-8	Translations-Initiierungs-Faktor
<i>CG14757</i>	(2)1244	44 B1-2	Prolin-reiches Protein
-	(2)2114	-	-
<i>CG11371</i>	(2)2220	21 A5	BcDNA:LD26519
<i>CG17879</i>	(2)2242	21-60	-
<i>CG15615</i>	(2)2269	53 D2-E10	-
<i>RpL18A</i>	(2)2281	54 C11-D1	<i>Ribosomal protein L18A</i> (strukturelles Protein)
-	(2)2441	-	TART-Unterfamilie B-Transposon
-	(2)2507	-	-
<i>CG17059</i>	26140	49 F11-13	-
<i>CG12128</i>	26462	46 D4-7	-
<i>CG6968</i>	35012	78 D1-2	-
-	35062	88 C-88 D	AC007808
<i>CG12078</i>	35064	63 C1	-
<i>CG14873</i>	35134	89 A2	-
<i>Hsp70Aa</i>	36012	67 F3	<i>Heat-shock-protein-70Aa</i>

Tab. 2-A: Kandidaten-Gene aus dem Fehlexpressions-„Screen“

### 2.2.2 Auswahlkriterien für weitergehende Analysen von Kandidaten-Linien

Als weiter zu bearbeitende Kandidaten wurden jene *P{EP}*-Linien ausgewählt, die in der Fehlexpression eine Störung der Körperwandmuskulatur aufwiesen. Bei „plasmid rescue“-Experimenten von diesen Linien und einer Datenbanksuche der erhaltenen Sequenzen sollte die Integration des *P{EP}*-Elements in der 5'-untranslatierten Region oder im Intron eines Gens erfolgt sein. In diesen Kandidaten sollte das *P{EP}*-Element eine Orientierung aufweisen, welche eine Gal4-gesteuerte Fehlexpression des Kandidaten-Gens ermöglicht. Ein weiteres Auswahlkriterium für die weiterführende Charakterisierung einer *P{EP}*-Linie war das embryonale Expressionsmuster des betroffenen Kandidaten-Gens in Regionen des Embryos, in denen Migrationsprozesse stattfinden. Dies wurde mit „whole mount“-*in situ*-Hybridisierungen an Wildtyp-Embryonen mithilfe DIG-markierter RNA-Sonden von cDNA-Klonen der Kandidaten-Gene visualisiert (Abb. 2-3; 2-4; 2-6). Ferner war die Induzierbarkeit der Expression der Kandidaten-Gene durch einen beliebigen Gal4-Treiber ein weiteres Kriterium. Daher wurden die Kandidaten-Gene mithilfe des *enGal4*-Treibers aktiviert (Abb. 2-2e; 2-5e) und auf Expression in der *engrailed*-Expressionsdomäne, mittels *in situ*-Hybridisierungen, hin untersucht.

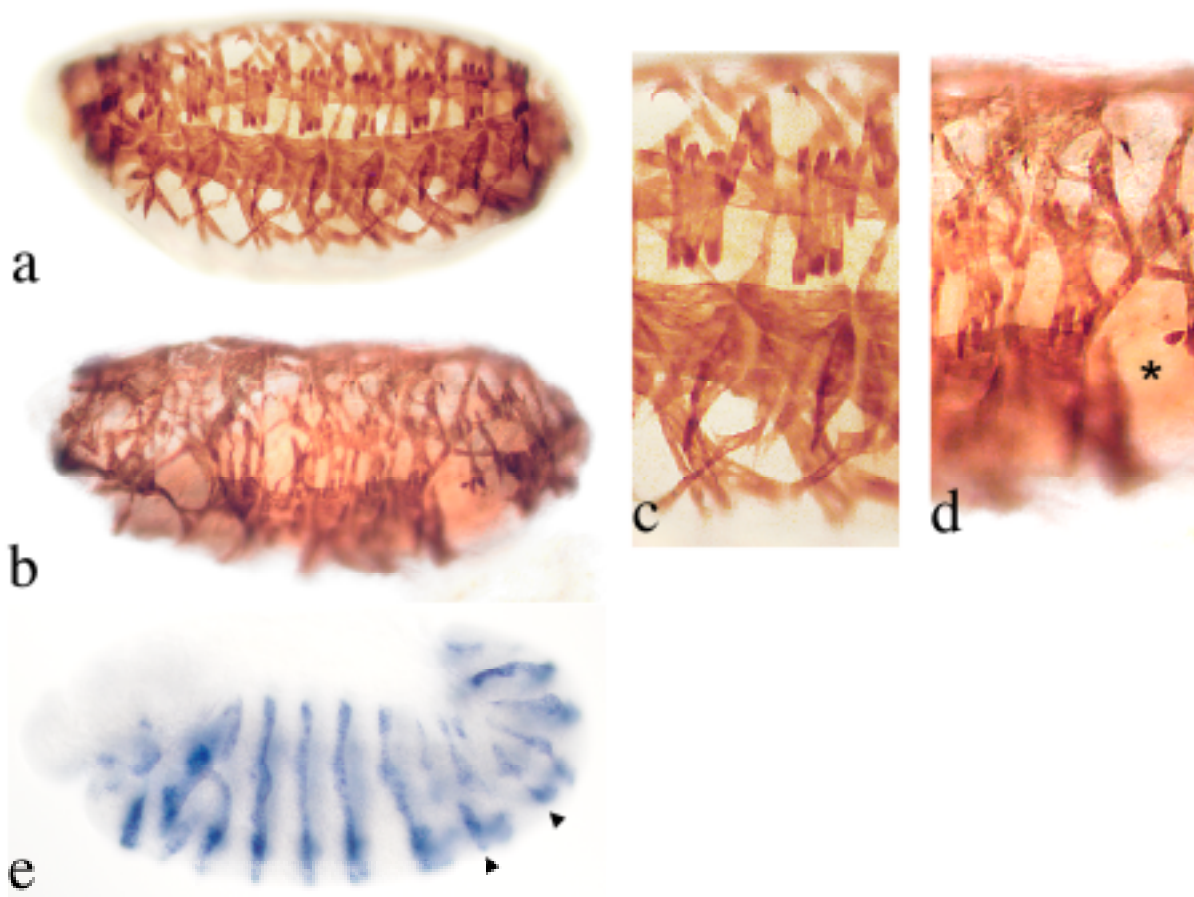
### 2.3 Wirkungsnachweis des Fehlexpressions- „Screens“

Nachfolgend sind die induzierten Muskelphänotypen bzw. die endogene Expression der Kandidaten-Gene zweier *P{EP}*-Linien dargelegt. Diese Beispiele können als Beleg der Spezifität des durchgeführten „Screens“ dienen, da die Gene charakterisiert sind und ihre Beteiligung bei der Muskelentwicklung bereits festgestellt bzw. diskutiert wurde. So wird das *Syndecan*-Gen (*Sdc*), das von der *P{EP}21140*-Linie betroffen ist, in den Muskelanhaftungsstellen von *Drosophila* exprimiert (Spring et al., 1994). Funktionelle Daten dieses Gens, einschließlich „loss-of-function“- oder Fehlexpressions-Phänotypen der mutanten Individuen, sind nicht publiziert. Das der *P{EP}36772*-Insertion benachbart liegende *Toll*-Gen (*Tl*) (Anderson et al., 1985) wird ebenfalls an den Segmentgrenzen, in der Epidermis und in einzelnen Muskeln exprimiert (Gerttula et al., 1988). Das zygotische Toll-Protein ist für eine normale Muskelentwicklung notwendig (Halfon et al., 1995). In Abwesenheit von zygotischem Toll, zeigen etwa 50% aller Hemisegmente einen Muskelmusterdefekt, der mit fehlenden, duplizierten und fehlgeleiteten Muskelfasern einhergeht (Halfon und Keshishian, 1998).

#### 2.3.1 Fehlexpressions-Phänotyp von *P{EP}21140* und Expression von *Syndecan*

Die *sr239Gal4*-Treiberlinie (Piepenburg et al., 2000) vermittelt die Expression des Gal4-Proteins in einem Streifen an den Segmentgrenzen, in der *stripe*-Expressionsdomäne. Die Überexpression von *Sdc* in dieser Domäne führte zu einer inkorrekten Befestigung der

Muskeln an die Epidermis (Abb. 2-2 b). Auch die Gestalt und Orientierung der Muskeln waren anomal. Im besonderen Maße waren dabei Muskeln betroffen, die zwischen den Segmentgrenzen gespannt sind (Abb. 2-2 d; Asterisk). Ein solcher Phänotyp ist durch eine fehlerhafte Verankerung der Muskeln an den Apodemen der Segmentgrenzen zu erklären. Muskeln lösen sich infolge der ersten Kontraktion von der Epidermis und ziehen sich zusammen. Weiterhin wurde die Induzierbarkeit des *Sdc*-Gens in der *P{EP}21140*-Linie durch Einkreuzen der *enGal4*-Treiberlinie verifiziert (Abb. 2-2 e). Die Fehlexpression von *Sdc* in der *engrailed*-Domäne verursacht ebenfalls einen embryonalen Phänotyp. Dieser ist durch Lücken im *engrailed*-Streifenmuster gekennzeichnet, welches durch die *Sdc*-cDNA visualisiert werden kann (Abb. 2-2 e, Pfeile).



**Abb. 2-2: Fehlexpressionsphänotyp der *P{EP}*-Insertionslinie 21140**

Die Körperwandmuskulatur des *Drosophila*-Embryos wurde mithilfe des  $\alpha$ MHC-Antikörpers angefärbt. Die Linie *P{EP}21140* wurde mit der *sr239Gal4*-Treiberlinie gekreuzt. Alle Embryonen sind im Folgenden, wenn nicht anders angegeben, lateral (dorsal nach oben, anterior nach links) ausgerichtet.

- a) OreR Wildtyp Embryo
- b) *P{EP}21140* / *sr239Gal4*
- c) Ausschnittsvergrößerung zweier Segmente aus (a).
- d) Ausschnittsvergrößerung zweier Segmente aus (b). Die Fehlexpression von *Sdc* führt zu falsch positionierten Muskelfasern mit anomaler Gestalt zwischen den Segmentgrenzen (Asterisk).

**Abb. 2-2:**

**e) *P{EP}21140 / enGal4***

Die Induzierbarkeit der *P{EP}*-Linie wurde durch Einkreuzen der *enGal4*-Treiberlinie getestet. Mithilfe einer „antisense“-RNA-Sonde gegen die *Sdc*-cDNA konnte das fehl-exprimierte *Sdc*-Transkript in der *engrailed*-Expressionsdomäne nachgewiesen werden. Die Fehlexpression von *Sdc* verursacht Lücken in der *engrailed*-Domäne (Pfeile deuten auf unterbrochene Streifen).

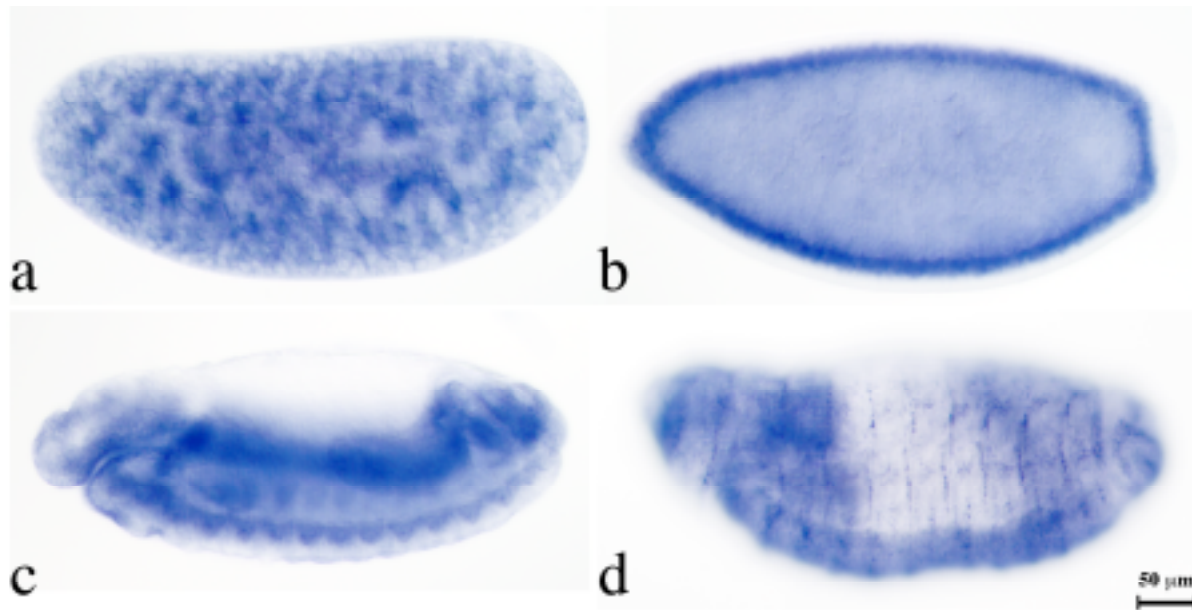
Syndecan-Proteoglykane sind transmembrane Heparansulfat-Moleküle auf Zelloberflächen, die eine wichtige Rolle bei Zelladhäsionsprozessen in Vertebraten spielen (Oh et al., 1997). Mitglieder der Syndecan-Familie ähneln Integrinen in mehreren Aspekten:

- 1) Beteiligung an Zelloberflächenadhäsion (Liu et al., 1998)
- 2) Begrenzung auf Zell-Matrix-Kontakte (fokale Adhäsion) (Woods und Couchman, 2001)
- 3) Kontaktstellen der Kommunikation zwischen intrazellulären Signalmolekülen und der extrazellulären Umgebung (Übersicht: Carey, 1997; Rapraeger und Ott, 1998)

Integrine sind bei *Drosophila* für die Adhäsion zwischen verschiedenen Zellschichten, bei der Bildung von komplexen Geweben, beteiligt (Übersicht: Brown, 2000). Ferner sind sie für die Verankerung der Muskelfasern an die epidermalen Anhaftungsstellen essenziell. Muskel- bzw. Apodem-spezifische Integrin-Heterodimere (alpha / beta) liegen an diesen Kontaktstellen konzentriert vor (Martin-Bermudo und Brown, 2000). Die Verankerung der Muskeln an die Epidermis wird über eine Bindung der Integrine an die extrazelluläre Matrix vermittelt. Auf diese Weise wird die feste Adhäsion zwischen Muskeln und der Epidermis etabliert, welche den Zugkräften einer Muskelkontraktion standhalten muss. In mutanten Phänotypen von Integrinen löst sich diese Verankerung, wodurch sich Muskeln abtrennen und in der Folge abrunden (Wright, 1960).

Die zygotsche Expression von *Syndecan* ist im Darm und somatischen Mesoderm zu erkennen (Stadium 12; Abb. 2-3 c). Später wird *Sdc* im ZNS und den epidermalen Muskelanheftungsstellen exprimiert (Stadium 17; Abb. 2-3 d). Der Muskelphänotyp der fehlexprimierten *P{EP}21140*-Linie und die Expression lässt eine Integrin-ähnliche (analoge) Funktion erwarten.





**Abb. 2-3: Expressionsmuster von *Sdc* während der Embryogenese von *Drosophila***

Mithilfe der *Sdc*-cDNA-(LD08230)-spezifischen, Digoxigenin-markierten „antisense“-RNA-Sonde wurden *in situ*-Hybridisierungen an OreR Wildtyp-Embryonen durchgeführt.

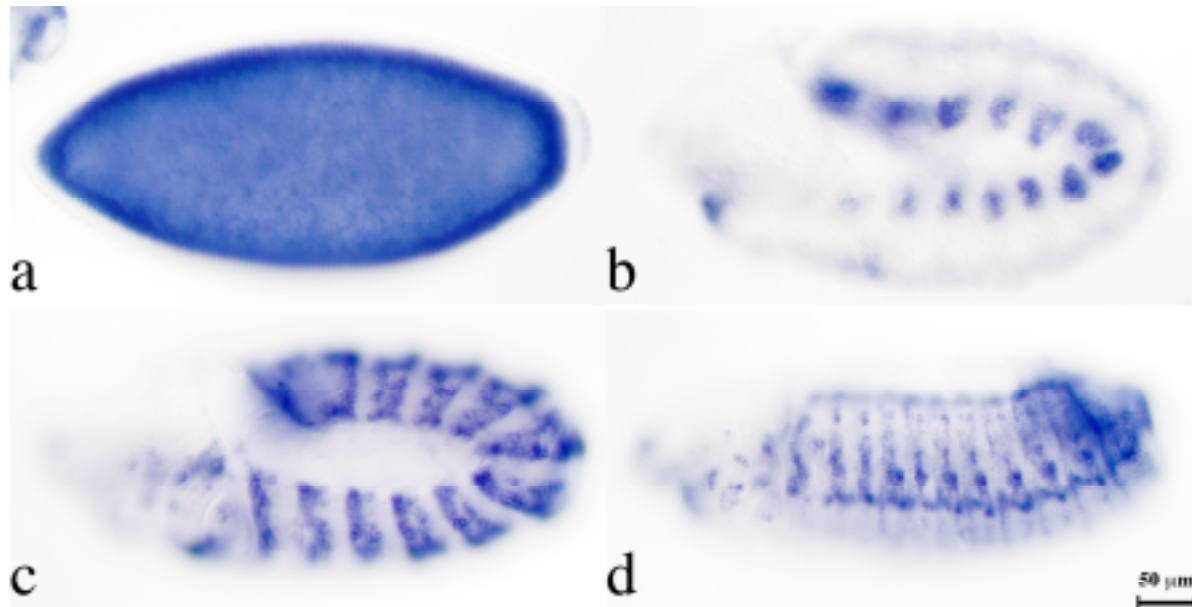
- a) Stadium 4 : schwache ubiquitäre Expression (maternale Komponente)
- b) Stadium 5 : Expression an der basalen Oberfläche der blastodermalen Zellschicht
- c) Stadium 12 : zygotische Expression im Darm, ZNS und somatischen Mesoderm
- d) Stadium 17 : Expression im ZNS und in den Apodemen

### 2.3.2 Fehlexpression von *P{EP}36772* und Expression von *Toll*

*P{EP}36772*-Expression mit der *sr239ΔPanGal4* Treiberlinie führte zu embryonaler Letalität. Die *P{EP}*-Insertion war in der 5'-Region des *Toll*-(*Tl*)-Gens (Anderson und Nüsslein-Volhard, 1984) erfolgt. Das *Tl*-Gen kodiert für einen glykosylierten Transmembranrezeptor (Morisato und Anderson, 1994). Neben seiner Rolle in der Signaltransduktion ist *Toll* auch für Zelladhäsionsprozesse notwendig (Keith und Gay, 1990). Es wirkt als maternales Effektorgen, welches eine zentrale Rolle bei der Bildung der embryonalen dorso-ventralen Achse spielt (Morisato und Anderson, 1995).

Die zygotische Expression erfolgt dynamisch an vielen Zelloberflächen (Mesektoderm, Mitteldarm, Splanchnopleura: Vorläufer des viszeralen Mesoderm). Später in der Embryogenese ist das Transkript epidermal, an der intersegmentalen Grenze und einigen ventralen somatischen Muskeln zu finden (Hashimoto et al., 1991; Nose et al., 1992) (Abb. 2-4 d). Eine Fehlexpression von *Toll* in der Muskulatur mittels eines *MHC'-Toll<sup>+</sup>*-Transgens verhindert die Synaptogenese von Motoneuronen, welche die ventralen Muskeln innervieren (Rose et al., 1997). Die genomische Organisation der *P{EP}36772*-Linie deutete darauf hin, dass in der Fehlexpressions-Situation durch diese *P{EP}*-Insertion eine „antisense“-RNA

eines Teils des *Tl*-Gens gebildet wurde. Die embryonale Letalität könnte durch eine Dosis-Verringerung der *Toll*-Expression in den überlappenden endogenen Expressions- bzw. Fehlexpressions-Domänen an den Segmentgrenzen verursacht worden sein.



**Abb. 2-4: Expressionsmuster von *Toll* während der Embryogenese von *Drosophila***

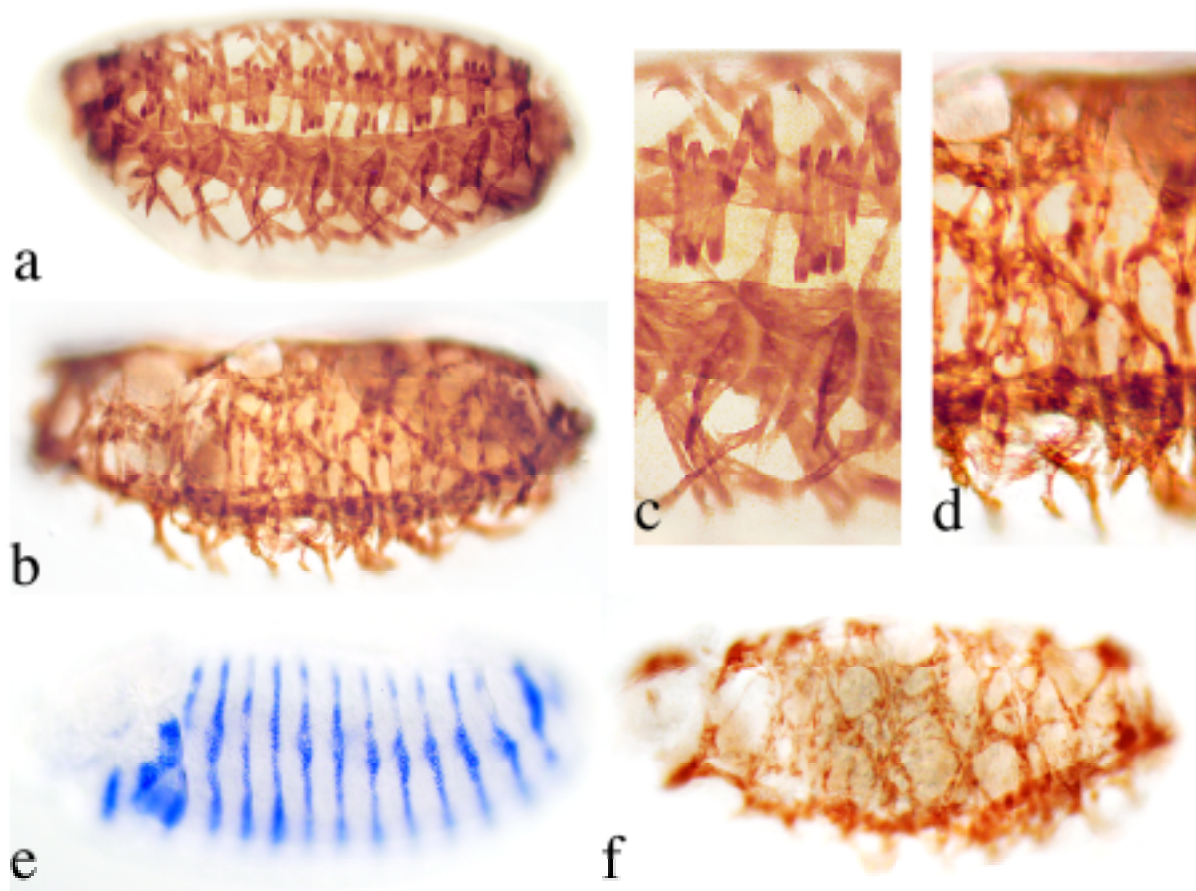
Mithilfe einer *Toll*-cDNA-spezifischen (Maxton-Küchenmeister et al., 1999), Digoxigenin-markierten „antisense“-RNA-Sonde wurden *in situ*-Hybridisierungen an OreR Wildtyp-Embryonen durchgeführt.

- a) Stadium 4 : Expression im zentralen Dotter (maternale Komponente)
- b) Stadium 11 : Expression im Splanchnopleura (Primordium des viszeralen Mesoderms)
- c) Stadium 12 : Segmentale Expression in der Epidermis
- d) Stadium 15 : Expression in den Apodemen und einer Gruppe somatischer ventraler Muskeln

## 2.4 Die *P{EP}35059*-Insertion im annotierten Gen *CG4963*

Das *P{EP}*-Element der 35059-Linie inserierte in der 5'-Region, 673 bp vor dem Startcodon, eines im Zuge der Genomannotierung vorhergesagten Gens, dass auf dem 3. Chromosom in Region 98 B2-3 lokalisiert ist. Von diesem Gen wurde in diesem Fall ein „sense“-RNA-Transkript gebildet. Das prognostizierte Gen *CG4963* (Myers et al., 2000) kodiert für ein bislang nicht charakterisiertes *Drosophila*-Protein, das in der beschriebenen Fehlexpressions-Situation die gerichtete Muskelwanderung beeinflusst, und von dem noch keine Mutation bekannt ist. Bei Embryonen, in denen *CG4963* mittels der *P{EP}35059*-Insertion fehl-exprimiert war, wurde ein variabler Muskelmusterphänotyp beobachtet. Einige Muskeln fehlten, andere Muskelfasern fusionierten miteinander oder waren anomal geformt (Abb. 2-5 b, d). Die Induzierbarkeit der *P{EP}35059*-Linie konnte durch eine Kreuzung mit dem *enGal4*-Treiber bestätigt werden (Abb. 2-5 e). Der beschriebene Muskelfhänotyp des induzierten *P{EP}*-Elements konnte auch durch die Fehlexpression des *UAST<sub>CG4963</sub>*-

Konstrukts in transgenen Fliegen (4.3.2) unter Kontrolle des *sr239ΔPanGal4*-Treibers verifiziert werden (siehe Abb. 2–5 f).

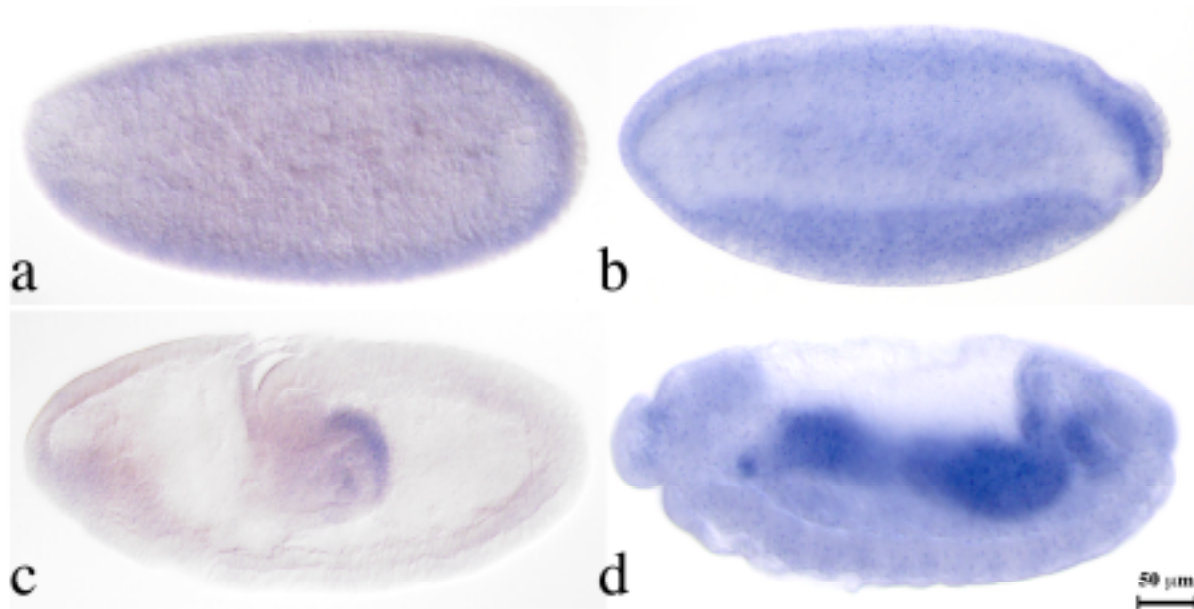


**Abb. 2-5: Fehlexpressionsphänotyp der *P{EP}*-Insertionslinie 35059**

Die Körperwandmuskulatur des *Drosophila*-Embryos wurde mithilfe des  $\alpha$ -MHC-Antikörpers angefärbt. Die Linie *P{EP}35059* wurde mit der *sr239ΔPanGal4*-Treiberlinie gekreuzt.

- a) OreR Wildtyp Embryo
- b) *P{EP}35059* / *sr239ΔPanGal4*
- c) Ausschnittsvergrößerung zweier Segmente aus (a)
- d) Ausschnittsvergrößerung zweier Segmente aus (b). Die Fehlexpression von *CG4963* führt zu fusionierten Muskelfasern mit abnormaler Gestalt und langen Fortsätzen.
- e) *P{EP}35059* / *enGal4*  
Die Induzierbarkeit der *P{EP}*-Linie wurde durch Einkreuzen der *enGal4*-Treiberlinie getestet. Mithilfe einer „antisense“-RNA-Sonde gegen die *CG4963*-cDNA konnte das fehlexprimierte *CG4963*-Transkript in der *engrailed*-Domäne nachgewiesen werden.
- f) *UAST<sub>CG4963</sub>* / *sr239ΔPanGal4*  
Die Induzierbarkeit der *UAST<sub>CG4963</sub>*-Linie wurde durch Einkreuzen der *sr239ΔPanGal4*-Treiberlinie getestet. Mithilfe des  $\alpha$ -MHC-Antikörpers wurde die Körperwandmuskulatur visualisiert. Der Muskelmusterphänotyp ähnelt dem der induzierten *P{EP}*-Linie (b)

Die endogene Expression des *CG4963*-Gens ist zunächst im Endoderm und später im Mitteldarm sichtbar (Abb. 2-6 b-d). Das deutet darauf hin, dass das *CG4963*-Genprodukt keine endogene Funktion bei der Muskelführung besitzt. Möglicherweise ist das Protein jedoch bei Migrationsprozessen im Darmgewebe involviert.



**Abb. 2-6 : Expressionsmuster von *CG4963* während der Embryogenese von *Drosophila***

Mithilfe einer *GH09840*-cDNA-spezifischen, Digoxigenin-markierten „antisense“-RNA-Sonde wurden *in situ*-Hybridisierungen an OreR Wildtyp-Embryonen durchgeführt.

- a) Stadium 4 : sehr schwache ubiquitäre Expression (maternale Komponente)
- b) Stadium 6 : Expression in der unter den Polzellen liegenden somatischen Zellschicht
- c) Stadium 10 : zygotische Expression in der posterioren Mitteldarmlasche
- d) Stadium 12 : Expression im prospektiven Mitteldarm

Nach der Computervorhersage der Datenbank *FlyBase* kodiert *CG4963* für ein mitochondriales Energie-Transferprotein. Das Gen weist Homologie zur „solute carrier“-Familie 25 auf [(Homo sapiens (gi:4507009); Mus musculus (AF076981); Onchocerca volvulus (U45998) Saccharomyces cerevisiae (L0001179)]. Da ein solcher Substrat-Carrier im allgemeinen der Energieversorgung von Zellen dient, ist der beobachtete Muskelphänotyp möglicher Weise auf Zell-Nekrose zurückzuführen. Aus diesem Grund wurde diese Linie nicht weiter untersucht.

## 2.5 Analyse des *aeneas*-Gens (*CG14648*)

Die *P{EP}*-Insertionslinie 36553 wurde aus den aufgeführten Kandidaten-Linien für eine detaillierte Analyse ausgewählt. Das vom *P{EP}*-Element induzierte, *in silico* vorhergesagte Gen *CG14648* wird im Folgenden aufgrund eines Migrationsphänotyps der Ur-Keimzellen (2.9) als *aeneas* bezeichnet. Die „Aeneis“ von Vergil, das Nationalepos des alten Roms, war Quelle der Inspiration für den Namen des mutanten Phänotyps des *CG14648*-Gens. Die „Irrfahrt“ einzelner primordialer Keimzellen, sollte hier durch die Aeneas-Metapher symbolisiert werden.

Der Muskelphänotyp des *aeneas*-Gens in der Fehlexpressions-Situation und das endogene Expressionsmuster von *aeneas* während der Embryogenese von *Drosophila* wurden analysiert (2.5.1). Aus der *aeneas*-Expression während der Embryonalentwicklung wurden erste Hinweise auf die Funktion des Gens abgeleitet. Ferner wurde eine neue *aeneas*-Mutation (2.10) erzeugt und die phänotypische Analyse der beiden *aeneas*-Allele während der Keimzellwanderung durchgeführt (2.9; 2.11).

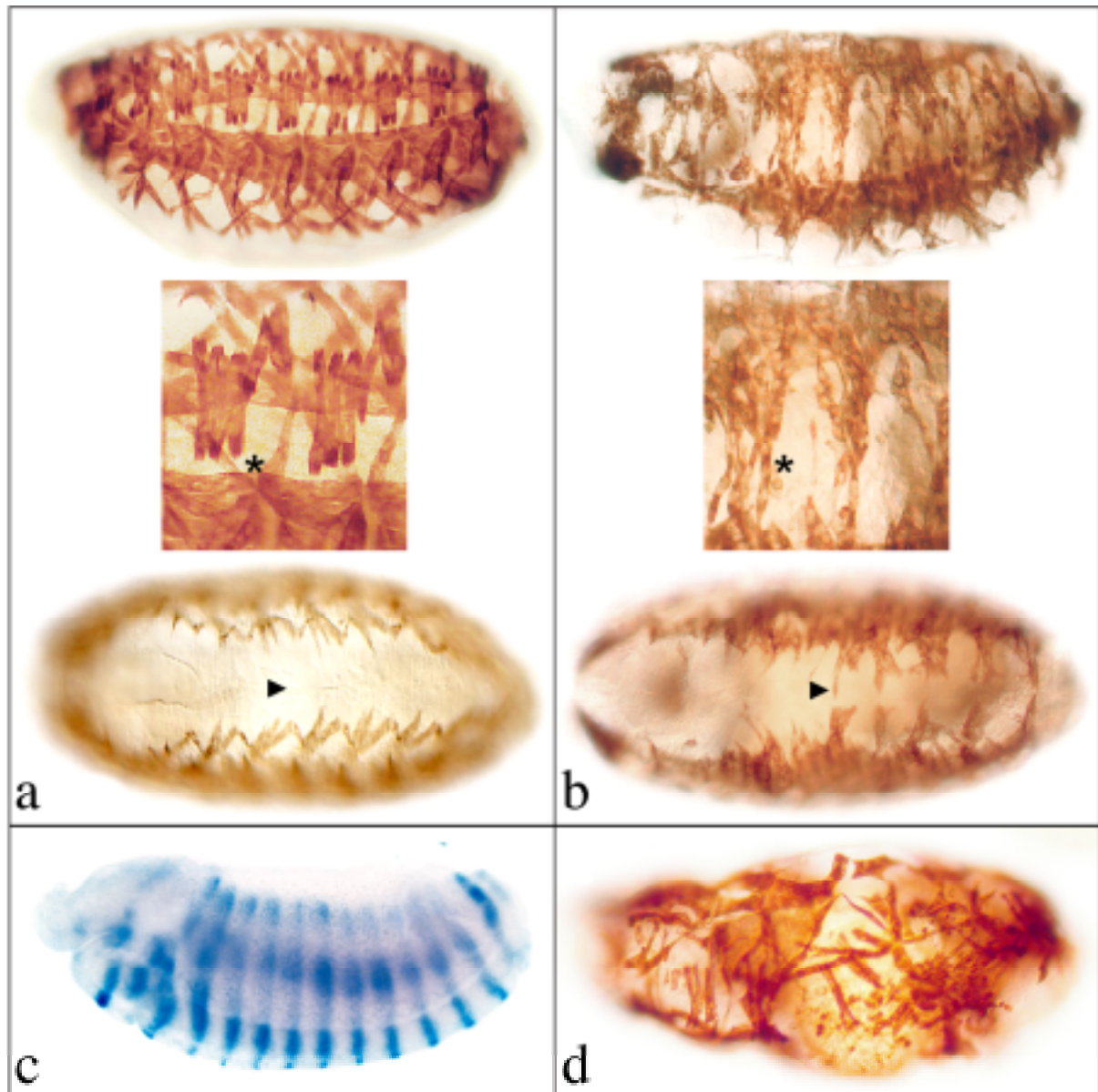
### 2.5.1 Fehlexpressionsphänotyp des *aeneas*-Gens

Die Fehlexpression der *P{EP}*-Insertionslinie 36553 mit der *sr239Gal4*-Treiberlinie (*stripe*-Expressionsdomäne) führte zu fusionierten Muskelfasern mit anomaler Gestalt und langen Fortsätzen. Einige Muskeln zeigten Auswüchse, die im Gegensatz zum Wildtyp ventral über die Mittellinie hinaus reichten (Abb. 2-7 b; Pfeil). Auch die transversalen Muskeln zeigten eine deutlich überstreckte Gestalt und waren unregelmäßig geformt. Die Defekte variierten jedoch sowohl in verschiedenen Embryonen als auch von einem Hemisegment zum anderen.

Die Induzierbarkeit des zur *P{EP}36553*-Linie 3'-benachbart liegenden *aeneas*-Gens wurde durch Einkreuzen der *enGal4*-Treiberlinie (Abb. 2-7 c) getestet. Mithilfe einer „antisense“-RNA-Sonde gegen die *aeneas*-cDNA konnte das induzierte *aeneas*-Transkript in diesen Embryonen in der *engrailed*-Expressionsdomäne nachgewiesen werden.

Um die Abhängigkeit des beobachteten Muskelphänotyps von der Überexpression des zum *P{EP}*-Elements benachbarten *aeneas*-Gens zu belegen, wurde ein eGFP-Fusionskonstrukt des offenen Leserahmens von *aeneas* (UAST<sub>eGFP-aeneas</sub>) in der *engrailed*-Domäne exprimiert (2.3.4). Auch diese Fehlexpression führte zu einem starken Muskelphänotyp (Abb. 2-7 d). Dieses Ergebniss deutet darauf hin, dass der *P{EP}*-induzierte Muskelphänotyp durch die Überexpression des *aeneas*-Gens verursacht wurde.





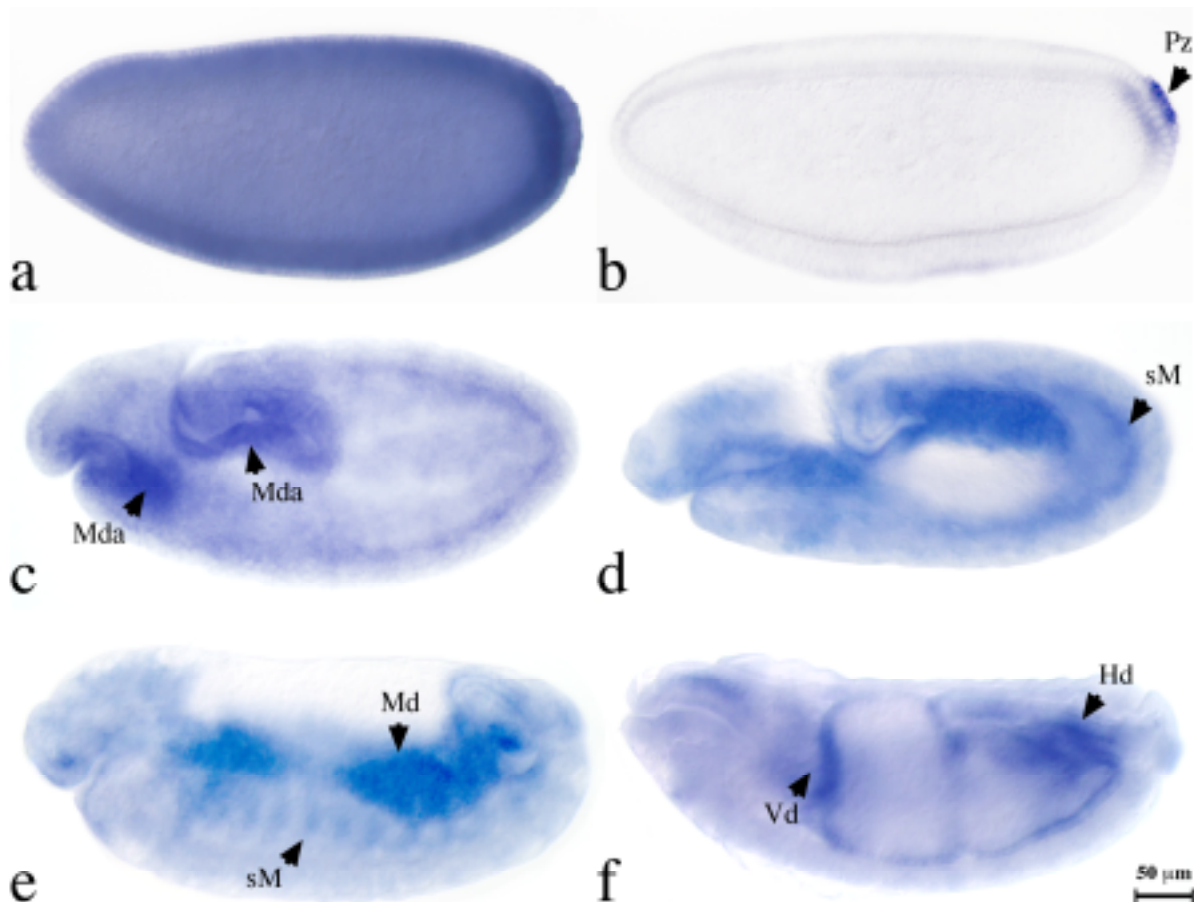
**Abb. 2-7: Fehlexpressionsphänotyp der *P{EP}*-Insertionslinie 36553**

Die Körperwandmuskulatur des *Drosophila*-Embryos wurde mithilfe des  $\alpha$ MHC-Antikörpers angefärbt. Die Linie *P{EP}36553* wurde mit der *sr239Gal4*-Treiberlinie gekreuzt.

- a) OreR Wildtyp Embryo (laterale Ansicht mit Ausschnittsvergrößerung und ventrale Aufsicht)
- b) *P{EP}36553 / sr239Gal4* (laterale Ansicht mit Ausschnittsvergrößerung und ventrale Aufsicht) Die Fehlexpression von *aeneas* führt zu fusionierten Muskelfasern mit abnormaler Gestalt und langen Fortsätzen (Asterisk). Muskeln überqueren inkorrekt die Mittellinie (Pfeil).
- c) *P{EP}36553 / enGal4* - Die Induzierbarkeit der *P{EP}*-Linie wurde durch Einkreuzen der *enGal4*-Treiberlinie getestet. Mithilfe einer „antisense“-RNA-Sonde gegen die *aeneas*-cDNA konnte das fehlexprimierte *aeneas*-Transkript in der *engrailed*-Expressionsdomäne nachgewiesen werden.
- d) *UAST<sub>eGFP-aeneas</sub> / enGal4* - Die Induzierbarkeit der *UAST<sub>eGFP-aeneas</sub>*-Linie 6A wurde durch Einkreuzen der *enGal4*-Treiberlinie getestet. Mithilfe des  $\alpha$ -MHC-Antikörpers wurde die Körperwandmuskulatur visualisiert.

### 2.5.2 Embryonale Expression des *aeneas*-Gens

Um einen Überblick über den zeitlichen und räumlichen Verlauf der endogenen Expression von *aeneas* zu erhalten, wurde das Expressionsmuster während verschiedener Stadien der Embryogenese untersucht. Da bisher kein spezifischer anti-*aeneas*-Antikörper erhalten werden konnte, wurde die *aeneas*-Expression mithilfe von Digoxigenin-markierten *LD30155*-cDNA-spezifischen „antisense“-RNA-Sonden nachgewiesen (4.1.15).



**Abb. 2-8: Expressionsmuster von *aeneas* während der Embryogenese von *Drosophila***

Mithilfe einer *LD30155*-cDNA spezifischen, Digoxigenin-markierten „antisense“-RNA-Sonde wurden *in situ*-Hybridisierungen an OreR Wildtyp-Embryonen durchgeführt.

- a) Stadium 4** : Ubiquitäre Expression (maternale Komponente)
- b) Stadium 5** : Expression in Polzellen (Pz) und den darunter liegenden somatischen Zellen
- c) Stadium 10** : Zygotische Expression in der anterioren und posterioren Mitteldarmanlage (Mda), das maternale Transkript in den Polzellen wird degradiert
- d) Stadium 11** : Expression im prospektiven Mitteldarm und im somatischen Mesoderm (sM)
- e) Stadium 12** : Expression im Mitteldarm (Md) und im somatischen Mesoderm (sM)
- f) Stadium 14** : Expression am Übergang vom Mitteldarm (Md) zum Vorderdarm (Vd) bzw. Hinterdarm (Hd)

Das *aeneas*-Transkript ist aufgrund der maternalen Komponente in den Embryonalstadien bis zum zellulären Blastoderm ubiquitär vorhanden (Abb. 2-8 a). Der Abbau des Transkripts erfolgt in den somatischen Zellen jedoch schnell, so dass im Stadium 5 der Anteil an *aeneas*-Transkript im Embryo signifikant reduziert ist. Im Gegensatz dazu scheint das maternale Transkript in den primordialen Keimzellen (Polzellen) stabilisiert zu sein (Abb. 2-8 b). Die zygotische Expression von *aeneas* erfolgt während der Gastrulation im Embryonalstadium 8, nach der anterioren und posterioren (amnioproktodealen) Invagination des Darms. Das Transkript ist zunächst in der Mitteldarmanlage zu erkennen (Abb. 2-8 c). Im Stadium 9 wird das maternale *aeneas*-Transkript in den Polzellen degradiert, kurze Zeit später wandern die Ur-Keimzellen durch die posteriore Mitteldarmtasche. Im selben Stadium tritt zygotische Expression im Mesoderm auf. Das Transkript kann bis zum Ende der Embryogenese im Mitteldarm (Abb. 2-8 d+e), später am Übergang zum Vorderdarm und Hinterdarm (Abb. 2-8 f), nachgewiesen werden.

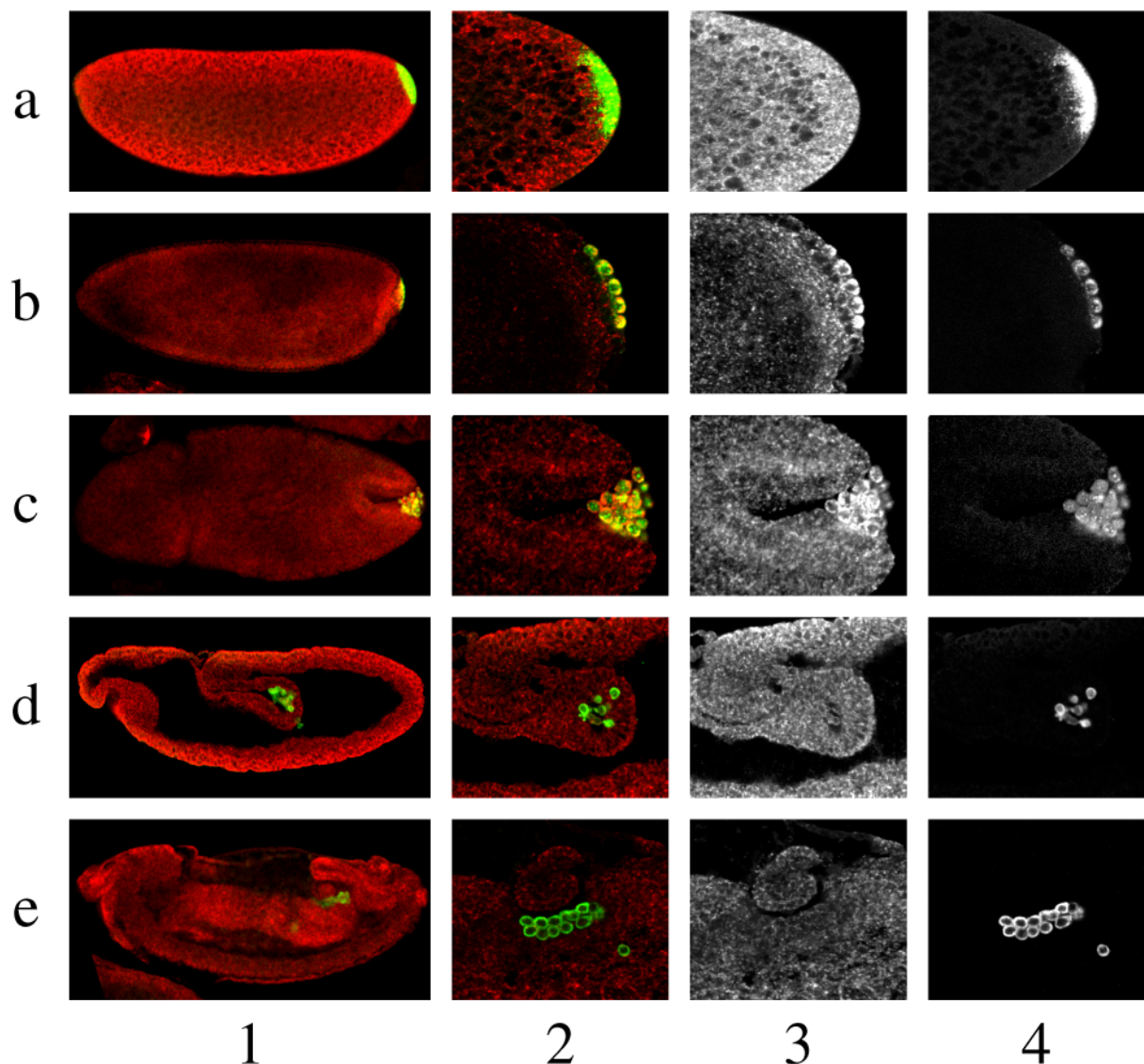


Abb. 2-9: Doppel-Fluoreszenz-Färbung *aeneas* *in situ* /  $\alpha$ Vasa Antikörper (Konfokalmikroskop)



**Abb. 2-9:**

Die *in situ*-Hybridisierungen und Antikörperfärbungen wurden an OreR-Embryonen durchgeführt.  
 Spalte (1) Übersichtsaufnahme; (2) vergrößerter Ausschnitt; (3) *in situ*-Kanal (rot in 1 und 2);  
 (4) Antikörper-Kanal (grün in 1 und 2) (1 und 2: Überblendung der Fluoreszenz-Kanäle);  
 Reihe (a, b, d, e) laterale Ansicht; (c) dorsale Aufsicht

a) Stadium 4: Ubiquitäre <i>aeneas</i> -Expression		Vasa-Protein am posterioren Pol
b) Stadium 5: blastodermale Zellularisierung		<b>(Kolokalisation)</b>
<i>aeneas</i> -Expression in Polzellen		Vasa-Protein in Polzellen
c) Stadium 6: amnioproktodeale Invagination		<b>(Kolokalisation)</b>
<i>aeneas</i> -Expression in Polzellen		Vasa-Protein in Polzellen
d) Stadium 9: Wanderung durch Mitteldarm		<b>(keine Kolokalisation)</b>
<i>aeneas</i> im prospektiven Mitteldarm		Vasa-Protein in Keimzellen
e) Stadium 12: <i>aeneas</i> -Expression im Mitteldarm		Vasa-Protein in Keimzellen

In Doppel-Fluoreszenz-Färbungen mit *aeneas*-, „antisense“-RNA (*LD30155*) und  $\alpha$ Vasa-Antikörper (Lasko und Ashburner, 1990), der spezifisch die Keimzellen markiert, wurde die räumliche und zeitliche Dynamik der Stabilisierung des *aeneas*-Transkripts in den Polzellen in Stadium 5 bis zu seiner Degradierung, kurz vor der Migration der Keimzellen durch das endodermale Darmgewebe in Stadium 9, näher betrachtet (Abb. 2-9). Auch diese Doppel-färbung zeigt ein stabiles maternales *aeneas*-Transkript in den primordialen Keimzellen und dessen Abbau in den Polzellen unmittelbar vor deren Durchwanderung des Mitteldarms.

### 2.5.3 Northern Blot-Analyse

In einer Northern Blot-Analyse von verschiedenen Entwicklungsstadien des OreR Wildtyp-Stammes von *Drosophila melanogaster* wurde die Größe der zugehörigen Transkripte im *aeneas*-Lokus bestimmt (Abb. 2.10). Nach Hybridisierung, mit einer radioaktiv markierten RNA-Sonde der *aeneas*-cDNA, konnten zwei poly(A)<sup>+</sup>-RNA Spezies mit einer Größe von etwa 2,0 kb bzw. 2,8 kb nachgewiesen werden, wobei die größere RNA-Bande mit dem vollständigen *LD30155*-cDNA-Klon korrespondiert. Die Expression des kurzen 2,0 kb-Transkripts ist deutlich schwächer als die des 2,8 kb langen Transkripts und ist nur in den Embryonalstadien sichtbar. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich hierbei eventuell um eine zusätzliche maternale RNA-Spezies handelt. Das längere Transkript wird dagegen auch in einigen späteren Entwicklungsabschnitten, wie in Stadium 3-Larven und Puppen, exprimiert. In adulten Tieren variiert die Transkriptmenge der 2,8 kb-langen poly(A)<sup>+</sup>-RNA zwischen Weibchen und Männchen, das Transkript wird in Weibchen etwas stärker exprimiert.

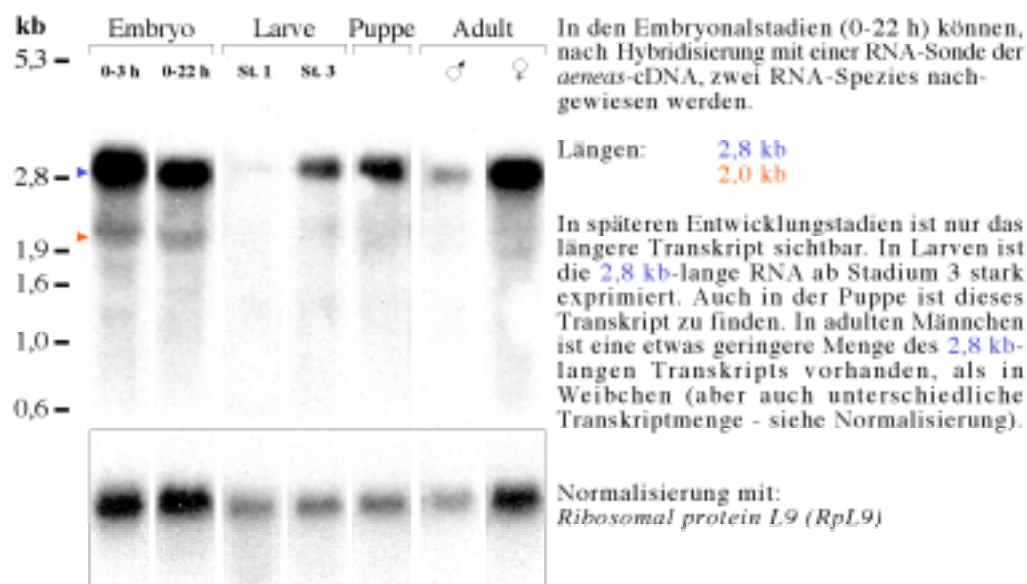
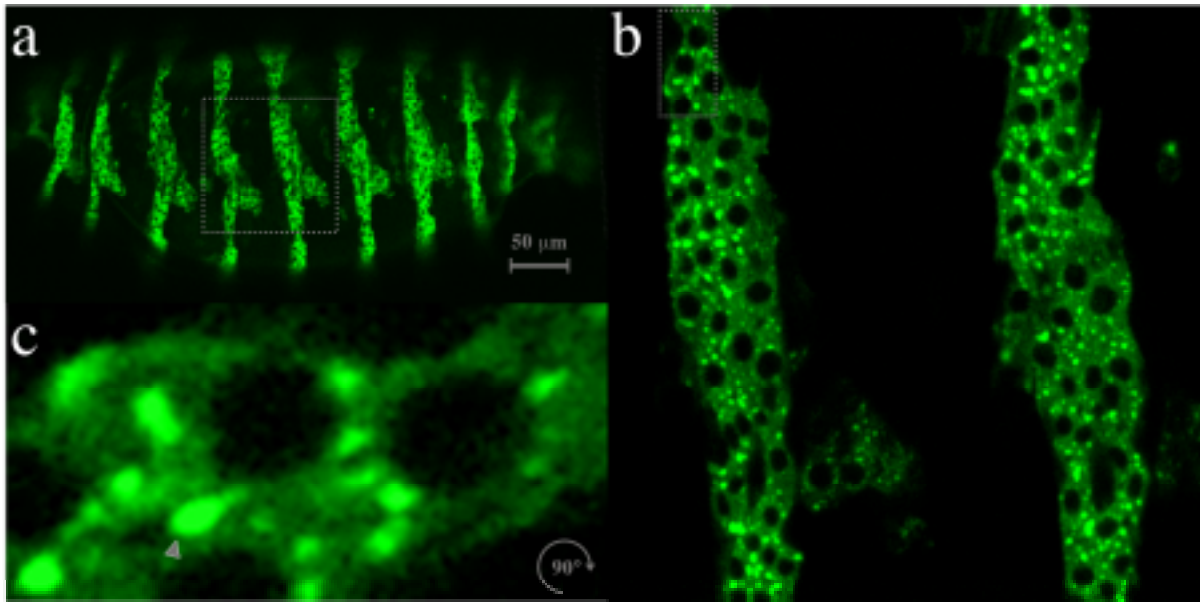


Abb. 2-10: Northern Blot-Analyse verschiedener Entwicklungsstadien (OreR Wildtyp-Stamm)

#### 2.5.4 Subzelluläre Lokalisation des Aeneas-Proteins

Da kein funktioneller Antikörper gewonnen werden konnte, wurde die subzelluläre Lokalisation des Aeneas-Proteins in einem Fusionskonstrukt mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* getestet (pUAST<sub>eGFP</sub>, freundlicherweise erhalten von B. Linder-Stuart). Ein Großteil des offenen Leserasters des *aeneas*-Gens (1.637 bp von 1.681 bp) wurde in einen Leserahmen mit der „enhanced GFP-Variante“ (eGFP), am 3′-Ende des Konstrukts, kloniert (Tab. 4-C). Ein 1.773 bp langes Fragment wurde durch Restriktionsverdau des cDNA-Klons *LD30155* mit BglII und SalI erhalten. Dieses Teilstück wurde in die Restriktionsstellen BglII / XhoI des pUAST<sub>eGFP</sub>-Vektors ligiert. Das Reporter-genkonstrukt ermöglicht die Gal4-gesteuerte Expression des UAST<sub>eGFP-aeneas</sub>-Konstrukts in transgenen Fliegen. Diese Transformanten wurden mit einer *enGal4*-Linie gekreuzt. So konnten F1-Individuen erhalten werden, die das Aeneas-eGFP-Fusionsprotein in der *engrailed*-Domäne exprimierten. Mithilfe einer konfokalmikroskopischen Analyse konnte die Lokalisation der Aeneas-Proteinfusion in der Zelle untersucht werden. Die Fluoreszenz war deutlich in granulatartigen Zellkompartimentstrukturen im Zytoplasma angereichert, der Zellkern blieb ausgespart. Die subzelluläre Lage dieser dreidimensionalen Struktur deutet auf eine Lokalisation des Aeneas-Protein im Golgi-Apparat hin.



**Abb. 2-11: Subzelluläre Lokalisation des Aeneas-eGFP-Fusionsprotein**

Die Induzierbarkeit der  $UAST_{eGFP-aeneas}$ -Linie wurde durch Einkreuzen der *enGal4*-Treiberlinie getestet. Mithilfe des Aeneas-eGFP-Fusionsproteins konnte die Verteilung von Aeneas im Zytoplasma der Zelle visualisiert werden. Die Fluoreszenz ist deutlich in Zellkompartimenten (Pfeil in (c)) angereichert, der Zellkern bleibt ausgespart. Der Embryo ist lateral (dorsal nach oben, anterior nach links) ausgerichtet.

- a)  $UAST_{eGFP-aeneas} / enGal4$  (Übersichtsaufnahme)
- b) Ausschnittsvergrößerung zweier Segmente aus (a) in unterschiedlicher Fokusebene
- c) Vergrößerung von zwei Epidermiszellen aus (b) (90° Drehung im Uhrzeigersinn)

## 2.6 Molekulare Charakterisierung des *aeneas*-Gens

Die molekularen Integrationsorte des  $P\{EP\}$ - und eines  $P\{lacW\}$ -Elements im *aeneas*-Gen wurden durch „plasmid rescue“-Experimente bzw. inverse PCR (4.1.10; 4.1.11) bestimmt. Die inverse PCR der Linie  $P\{EP\}36553$  führte zur Isolierung eines DNA-Fragments von etwa 1,0 kb. Nach der Sequenzierung wurden verschiedene *Drosophila*-Datenbanken durchsucht. Anhand dieser Abfragen konnten zwei genomische Klone und etliche cDNAs von *Drosophila melanogaster* bestimmt werden. Bei den genomischen Klonen handelt es sich um den Celera-Klon AC014874 und den BAC-Klon BACR15E02. Ein deutlicher Hinweis für die  $P\{EP\}$ -Element-Insertion in ein Gen, wurde durch die Identifizierung von 127 ESTs (expressed sequence tags), welche in dem *Clot.436* vereinigt sind, erbracht. Die DNA-Sequenz des Celera-Klons AC014874 (Venter et al., 1998) ist in der NCBI (National Center of Biological Information) Nukleotid-Sequenz-Bibliothek (Genbank) zu finden.

Weiterhin konnte die Insertion des  $P\{lacW\}$ -Elements *l(3)L1233* in einer Entfernung von 229 bp zur  $P\{EP\}36553$ -Insertion ermittelt werden. Im Zuge der Annotierung des Genoms von *Drosophila melanogaster* (Myers et al., 2000) wurde das *aeneas*-Gen unter dem Namen

CG14648 vorhergesagt. Der DGC (*Drosophila* Gene Collection) cDNA-Klon *LD30155* wurde zur Herstellung von „antisense“-RNA-Proben (4.1.15) verwendet, die bei *in situ*-Hybridisierungen (4.2.1) an Embryonen zur Identifikation der endogenen Expression eingesetzt wurden. Der EST-Klon *LD30155* repräsentiert die längste cDNA aus dem *Clot.436* (BDGP EST Database). Ferner deuten Northern Blot-Ergebnisse (Abb. 2.10) darauf hin, dass diese 2.693 bp lange cDNA das Gesamttranskript darstellt (2.5.3). Aus der Sequenzanalyse des *LD30155*-cDNA-Klons und der korrespondierenden genomischen DNA (Adams et al., 2000) wurde die Intron/Exon-Struktur der Transkriptionseinheit des Gens abgeleitet. Der *aeneas*-Genloкус umfasst demnach sechs Exons über einen genomischen Bereich von 3.189 bp.

Die *P{EP}36553*-Insertion erfolgte im 1.187 bp großen, ersten Intron des *aeneas*-Gens, und zwar vor Base 229 dieses Introns, die der Base 28.372 des genomischen Klons *AC014874* entspricht. Das oben genannte *P{lacW}l(3)L1233*-Element war im selben Intron inseriert, vor Base 457 dieses Introns, welche der Base 28.600 des Celera-Klons *AC014874* entspricht (Abb. 2-12). Die *P{lacW}*-Insertion war also 455 bp nach dem 1. Exon und 732 bp vor dem 2. Exon lokalisiert.

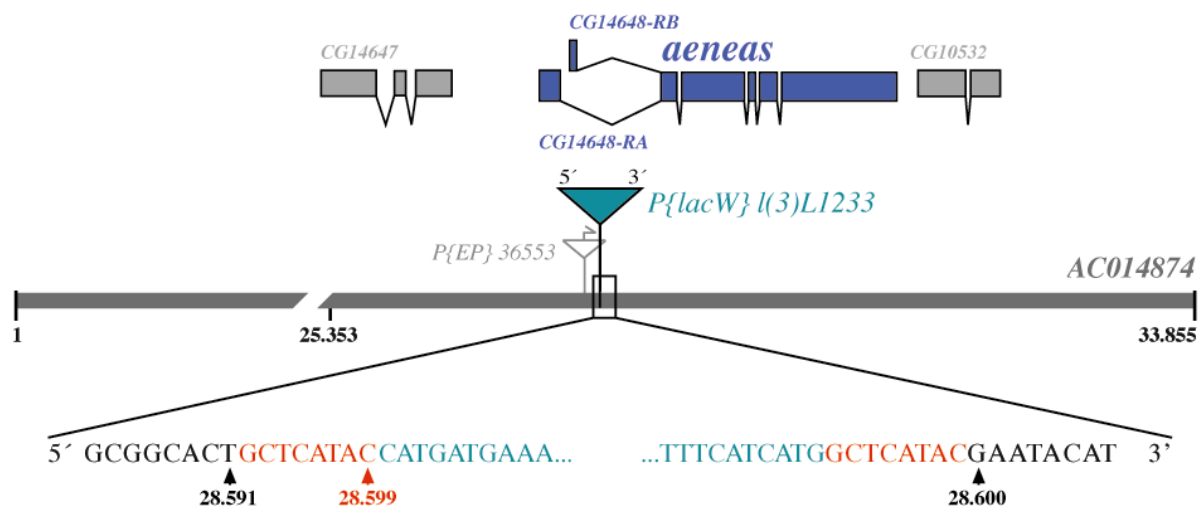


Abb. 2-12: Genomische Organisation des *aeneas*-Lokus (*P{lacW}*-Linie *l(3)L1233*)

Die Abbildung zeigt schematisch den genomischen Bereich, in dem *aeneas* lokalisiert wurde. Dargestellt ist der genomische Celera-Klon *AC014874* und der Integrationsort des *P{lacW}*-Elements *l(3)L1233*. Ebenso ist die relative Lage der annotierten Transkripte: *CG14648-RA* und *CG14648-RB* (Intron/Exon-Struktur) illustriert. In grau sind sowohl die beiden benachbarten, annotierten Gene *CG14647* und *CG10532*, als auch der Integrationsort des *P{EP}*-Elements *36553* angegeben. In schwarz ist der *aeneas*-Sequenzanteil (1. Intron *aeneas*) dargestellt. In rot ist die 8-Basenpaar-Duplikation zu sehen, die durch die *P{lacW}*-Insertion verursacht wurde. In grün sind die *P{lacW}*-Sequenzanteile gezeigt.

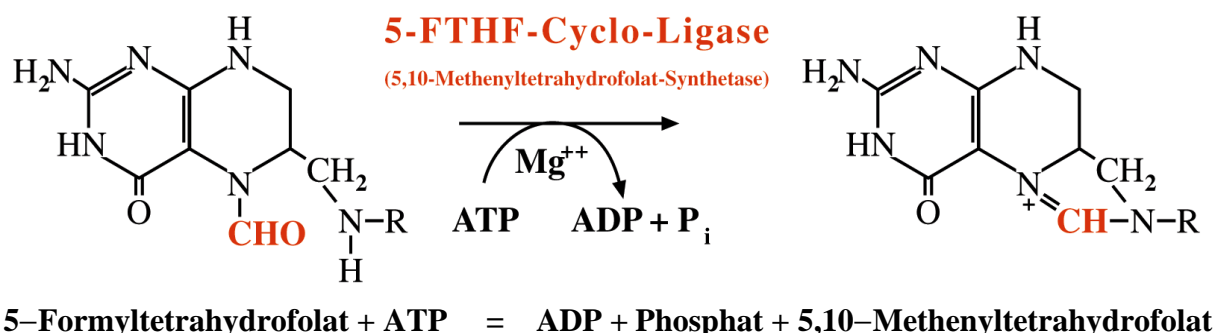
39



Der cDNA-Klon *LD30155* hat eine Gesamtlänge von 2.693 bp und zeigt ein offenes Leseraster von 1.635 bp. Er entspricht daher vermutlich dem längeren *aeneas*-Transkript (2.5.3). Das Startcodon (ATG) folgt nach Base 101 der cDNA im ersten Exon des Gens. Die Translation des offenen Leserasters ergibt ein Protein von 545 Aminosäuren mit einem abgeleiteten Molekulargewicht von 59,7 kD (ExPASy). Die Nukleotidsequenz des cDNA-Klons *LD30155* und die abgeleitete Aminosäuresequenz des Aeneas-Proteins ist in (Abb. 2–13). zu finden. Die Sequenz des genomischen Klons *AC014874* ist in der NCBI-Genbank zu finden.

### 2.6.1 Aeneas Protein-Domänen

Das 545 Aminosäuren lange Aeneas-Protein enthält eine Domäne, die 30%ige Homologie zur Konsensussequenz einer Enzymklasse (5-Formyltetrahydrofolat Cyclo-Ligase; 5-FTHF-Cyclo-Ligase) aufweist (Abb. 2-14). Diese Domäne beginnt bei Aminosäure 33 und endet an Position 232. Das Enzym katalysiert die Reaktion:



**Abb. 2-14: 5-FTHF-Cyclo-Ligase Aktivität**

Katalyse des Umsatzes von 5-FTHF zu 5-10-MTHF (Bertrand et al., 1987)

Die 5-Formyltetrahydrofolat Cyclo-Ligase dient der Aufrechterhaltung der intrazellulären Methionin-Konzentration und der Bereitstellung von Folsäurederivaten (Übersicht: Appling, 1991). Folsäure ist ein Vitamin, das als Coenzym eine Schlüsselfunktion bei der DNA-Synthese und im C1-Stoffwechsel hat. Bei der Umwandlung von Homocystein zu Methionin liefert das Folsäurederivat 5-Methyl-THF die Methylgruppe. Methionin ist notwendig zur Proteinsynthese. In seiner aktiven Form, S-Adenosylmethionin, ist es der wichtigste Donor für Transmethylierungs-Reaktionen von DNA, Proteinen und Lipiden. 5-FTHF-Cyclo-Ligase-Aktivität konnte in Form zytoplasmischer Granulate in Tumorzellen nachgewiesen werden (Tzortzatou-Stathopoulou et al., 1996). Beim Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* wirkt Folsäure als „chemoattractant“ und führt zur Reorganisation des Zytoskeletts und Ausbildung von Filopodien der vegetativen Amöbe (Rifkin, 2001).

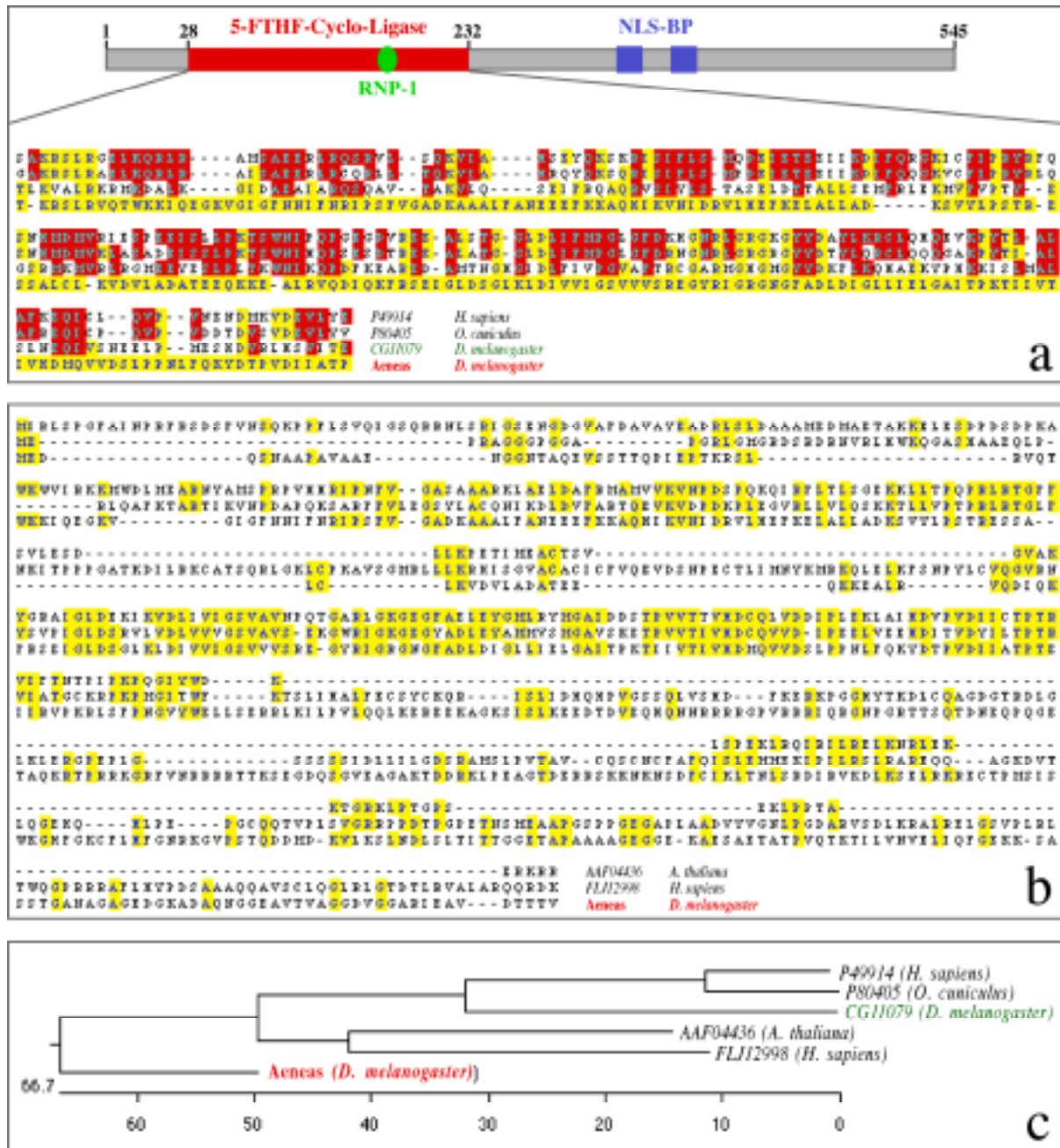


Abb. 2-15: Protein-Domänen in Aeneas

- Schematische Darstellung des Aeneas-Proteins (*InterPro motifs*) und der vorhergesagten Proteindomänen: RNA-Erkennungsmotiv (**RNP-1**), zweigeteiltes Kern-Lokalisationssignal (**NLS-BP**) und der putativen 5-Formyltetrahydrofolat Cyclo-Ligase (**5-FTHF-Cyclo-Ligase**). Sequenzvergleich der putativen **Aeneas**-Enzymdomäne mit 5-FTHF-Cyclo-Ligasen aus: *Homo sapiens* (P49914), *Oryctolagus cuniculus* (P80405) und einer weiteren putativen 5-FTHF-Cyclo-Ligase aus *Drosophila melanogaster* (CG11079).
- Sequenzvergleich des **Aeneas**-Proteins aus *Drosophila melanogaster* und zwei putativen Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* (AAF04436) bzw. *Homo sapiens* (FLJ12998).
- Phylogenetischer Stammbaum der Proteine aus (a) und (b).

Ein Sequenzabgleich der Enzymdomäne aus Aeneas und einer FTHF-Cyclo-Ligase aus *Homo sapiens* (P49914) zeigte mit 14% eine niedrige Identitätsrate der beiden Aminosäuresequenzen. Eine zweite vorhergesagte 5-FTHF-Cyclo-Ligase aus *Drosophila* (CG11079) weist im Gegensatz dazu eine 29%ige Identität zu P49914 auf und zeigt eine 36%ige Identität zur Konsensussequenz. In Abb. 2-15 a ist ein Sequenzabgleich der Aeneas-Enzymdomäne und FTHF-Cyclo-Ligasen aus Mensch (P49914), Kaninchen (P80405) und der Fliege (CG11079) dargestellt. Möglicherweise stellt das CG11079-Gen das eigentliche Fliegen-Homolog der 5-FTHF-Cyclo-Ligasen dar.

Ein Datenbank-Abgleich mit dem *aeneas*-Gen eröffnete, dass viele Organismen außer den 5-FTHF-Cyclo-Ligase-Genen noch eine zweite verwandte Genklasse besitzen, deren Gene eine höhere Homologie zu *aeneas* aufweisen. Diese Gene sind sowohl im Menschen (FLJ12998), in Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (AAF04436) und in Mikroorganismen wie *Aeropyrum pernix* (B72771) zu finden. In der Enzymdomäne ist das Aeneas-Protein zu 48% identisch und zu 75% ähnlich dem *H. sapiens* Protein (FLJ12998). Da keines der Gene dieser neuen Klasse bisher funktionell charakterisiert ist, konnte kein Rückschluss auf die biochemische Funktion von *aeneas* gezogen werden. Dass das Aeneas-Protein dieser Klasse angehört, wird durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von Aeneas und zwei Mitgliedern dieser Gruppe (FLJ12998; AAF04436) nahegelegt (Abb. 2-15 b).

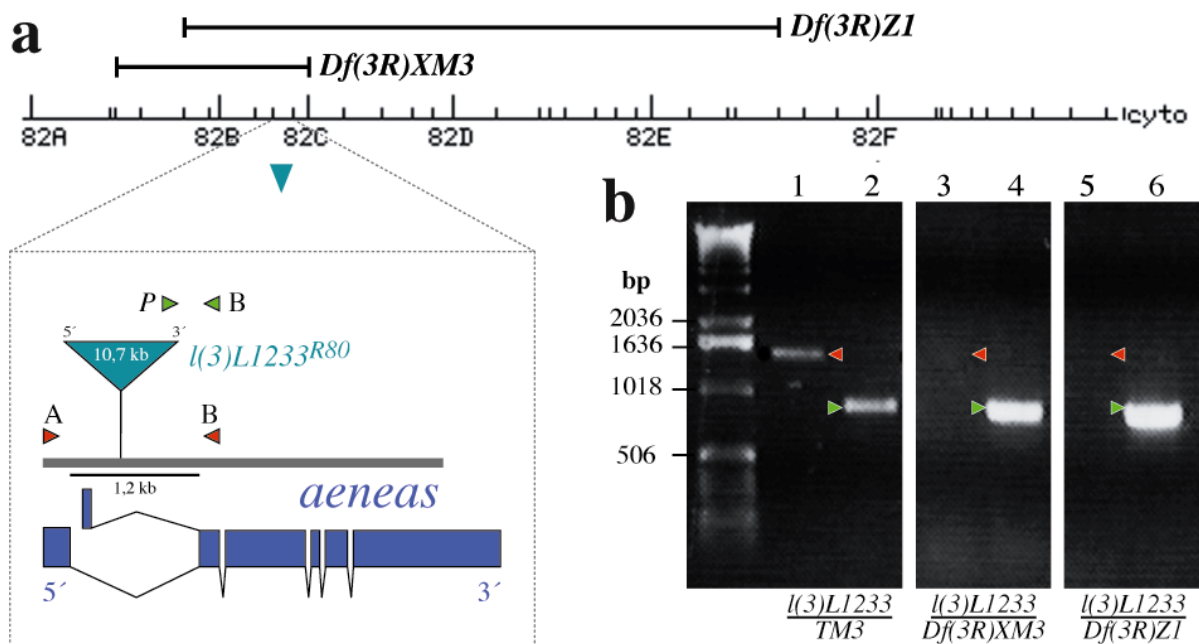
Des Weiteren enthält das Aeneas-Protein ein putatives RNA-Bindungsmotiv (RNP-1) und zwei Kern-Lokalisations-Signale (NLS-BP) (Abb. 2-15 a). Ohne weitere experimentelle Daten können diese beiden vorhergesagten Domänen jedoch nicht als verifiziert gelten, da diese Motive bei *in silico*-Vergleichen häufig auftreten. Ebenso deutet die Lokalisation des Aeneas-eGFP-Fusionsproteins (2.5.4) an, dass das Kern-Lokalisations-Signal nicht funktionell ist.

## 2.7 Charakterisierung der *P{lacW}l(3)L1233*-Linie

Die *P{lacW}*-Element-Linie *l(3)L1233* entstammt dem „Gene Disruption Project“ (Spradling et al., 1999). Stamm-Bezeichnungen des BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) beginnen mit einem Präfix, welches das Chromosom und den phänotypischen Effekt der individuellen *P{lacW}*-Insertion angibt. *l(3)L1233* ist danach rezessiv letal bzw. stark semiletal und befindet sich auf dem 3. Chromosom. Um den in Homozygotie letalen Phänotyp mit der *P{lacW}*-Insertion zu koppeln, wurden im Rahmen des „Gene Disruption Project“ die *P{lacW}*-Linien gegen große Defizienzen ausgekreuzt. Im Falle von *l(3)L1233* war das die Defizienz: *Df(3R)2-2* (81 F4–5; 83 A1–9). Der resultierende Genotyp: *l(3)L1233 / Df(3R)2-2* führte hierbei zu einem letalen Phänotyp, wie auch die *P{lacW}*-Element-Insertion in Homozygotie: *l(3)L1233 / l(3)L1233* (Spradling et al., 1999).



Die Überprüfung dieser Ergebnisse mit den kleineren Defizienzen *Df(3R)Z1* und *Df(3R)XM3*, die beide den Insertionslokus der *P{lacW}l(3)L1233*-Linie abdecken, ergab jedoch gegenteilige Ergebnisse. In unseren Untersuchungen waren weder transheterozygote *l(3)L1233 / Df(3R)Z1*- noch *l(3)L1233 / Df(3R)XM3*-Individuen in der F1-Generation letal. Die Defizienz *Df(3R)Z1* war zytologisch in Region (82 A5-6; 82 E4) und *Df(3R)XM3* in Region (82 A3-6; 82 B) kartiert. Beide sollten somit das *aeneas*-Gen deletieren. Die Kopplung der Letalität in Homozygotie und der *P{lacW}l(3)L1233*-Insertion war demnach nicht gegeben. Diese These wurde mittels einer PCR-Analyse der *P{lacW}l(3)L1233*-Linie (Abb. 2-16) überprüft.



**Abb. 2-16: Genomische PCR Analyse der *P{lacW}l(3)L1233*-Linie**

- a) Die Abbildung zeigt die Lokalisation des *aeneas*-Gens in einer zytologischen Karte. Die relative Lage von 2 Defizienzen (*Df(3R)XM3*; *Df(3R)Z1*), welche das Gen deletieren, ist dargestellt. Darunter ist als Ausschnittsvergrößerung schematisch die Intron/Exon-Struktur von *aeneas* und die korrespondierende genomische Region der *P{lacW}*-Linie *l(3)L1233* abgebildet. Die für die genomische PCR verwendeten Primer (A, B, P) sind als Pfeile dargestellt.
- b) PCR Analyse von genomischer DNA aus *l(3)L1233 / TM3* (1, 2), *l(3)L1233 / Df(3R)XM3* (2, 3) und *l(3)L1233 / Df(3R)Z1* (5, 6) Tieren. Diese heterozygoten Allelkombinationen sind lebensfähig. Im Gegensatz dazu führen die Allele in Homozygotie zur Letalität. Spur (1, 3, 5): Primerkombination (A+B). Spur (2, 4, 6): Primerkombination (P+B). In den Gel-Spuren (3, 5) ist kein Amplifikationsprodukt sichtbar. Das deutet darauf hin, dass die Defizienzen diesen Teil des *aeneas*-Gens deletieren. Die Letalität der homozygoten *P{lacW}*-Linie *l(3)L1233* wird also nicht durch die Integration des *P{lacW}*-Elements verursacht. Die Amplifikation des (A+B)-PCR-Produkts über das 10,7 kb-lange *P{lacW}*-Element hinweg wurde durch die spezifischen PCR-Parameter verhindert (4.1.12; Tab. 4-E)

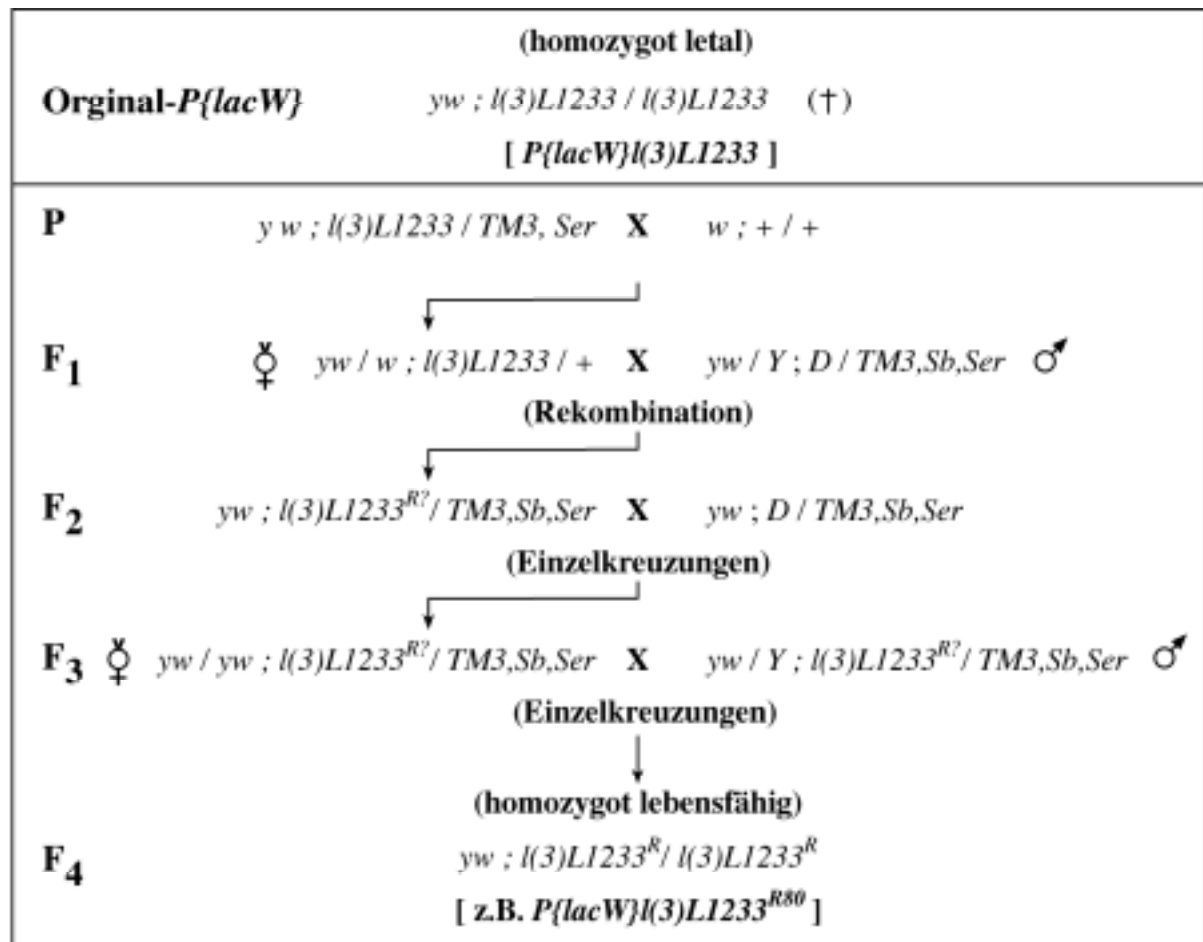
Mithilfe dieser PCR-Analyse von genomischer DNA aus *l(3)L1233/TM3*, *l(3)L1233/Df(3R)XM3*- bzw. *l(3)L1233/Df(3R)Z1*-Fliegen wurde zunächst die korrekte Kartierung dieser Defizienzen überprüft. Da diese heterozygoten Allelkombinationen lebensfähig waren, konnte genomische DNA von adulten Tieren verwendet werden. Mittels Primern aus verschiedenen kodierenden Bereichen und dem *P{lacW}*-Element konnte nachgewiesen werden, dass beide Defizienzen diesen Teil des *aneas*-Gens deletieren (Abb. 2-16). Die Letalität der *P{lacW}*-Linie *l(3)L1233* in Homozygotie wurde also nicht durch die Integration des *P{lacW}*-Elements verursacht, sondern mutmaßlich durch eine Sekundärmutation im Genom. Diese sekundäre Mutation lag wahrscheinlich im Bereich (81 F4-5; 83 A1-9), da die Allelkombination *l(3)L1233/Df(3R)2-2* Letalität verursachte (Spradling et al., 1999).

### 2.7.1 Trennung von *P{lacW}*-Insertion und Sekundärmutation mittels Rekombination

Allelkombinationen, hier *l(3)L1233* und die Sekundärmutation, können durch Rekombination wieder getrennt werden. Die Wahrscheinlichkeit ( $r$ ) für ein Rekombinationsereignis hängt vom Abstand der Genloki auf dem Chromosom ab. Nach Morgan rekombinieren Gene, die sich weiter von einander entfernt auf einem Chromosom befinden, leichter beim „cross over“ von Chromatiden. Die Extremfälle sind  $r = 0$  und  $r = 0,5$ . Im letzteren Fall spricht man von freier Rekombination. Die Rekombinations- oder „cross over“-Wahrscheinlichkeit diente schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts als Abstandsmaß genetischer Loci (Sturtevant, 1913).

Mithilfe einer Rekombinationskreuzung gegen den *white*<sup>1</sup>-Stamm wurde eine homozygot lebensfähige *P{lacW}*-Linie generiert (Abb. 2-17). In der F<sub>1</sub>-Generation konnte es zu Rekombinationsereignissen zwischen dem *P{lacW}*-Insertionsloкус und dem letalitätsauslösenden Sekundärmutationsloкус kommen. In weiteren Kreuzungen wurden Rekombinationsstämme etabliert und auf eine Entkopplung der beiden Loci hin getestet.

Von 500 (100%) Einzelkreuzungen in der F<sub>3</sub>-Generation konnten sechs Rekombinationslinien (1,2%;  $r = 0,012$ ) erzeugt werden, die homozygot lebensfähig waren (Tab. 2-B). Eine 1,2%ige Rekombinationsfrequenz ist äquivalent zu 1,2 cM. In *Drosophila melanogaster* entsprechen diese 1,2 cM etwa 600 kb. Die Sekundärmutation, welche in Homozygotie Letalität erzeugte, lag also tatsächlich innerhalb der Region, die von der Defizienz *Df(3R)2-2* (81 F4–5; 83 A1–9) deletiert wird. Somit wurde die Letalität ursprünglich fälschlicherweise mit der *P{lacW}l(3)L1233*-Insertion gekoppelt (Spradling et al., 1999). Im Weiteren wurde mit einer dieser homozygot lebensfähigen Rekombinationslinien (*l(3)L1233*<sup>R80</sup>) weiter gearbeitet.

Abb. 2-17: Rekombinations-Kreuzungsschema (Generierung der *P{lacW}l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Linie)

- P**) Kreuzung der heterozygoten *P{lacW}*-Linie mit einer *white*-Linie.
- F<sub>1</sub>**) Kreuzung von Tieren, welche die *P{lacW}*-Element-Insertion und den Wildtyp-Lokus tragen, mit Fliegen mit „Balancer“-Chromosom.
- F<sub>2</sub>**) Kreuzung von Nachkommen aus der F<sub>1</sub>-Kreuzung, in denen eventuell Rekombination (R?) zwischen der *P{lacW}*-Insertion und der putativen „Sekundärmutation“ stattgefunden hat, mit „Balancer“-Fliegen.
- F<sub>3</sub>**) Test auf Letalität bzw. Lebensfähigkeit von homozygoten Rekombinations-Linien.  
*Sb*= *Stubble*; *Ser*= *Serrate*; *D*= *Dichaete*; *w*= *white*; *y*= *yellow*  
*TM3*= „Balancer“-Chromosom für das 3. Chromosom von *Drosophila*;  
*l(3)LI233<sup>R</sup>*= *P{lacW}*-Element Linie nach Rekombination lebensfähig in Homozygotie

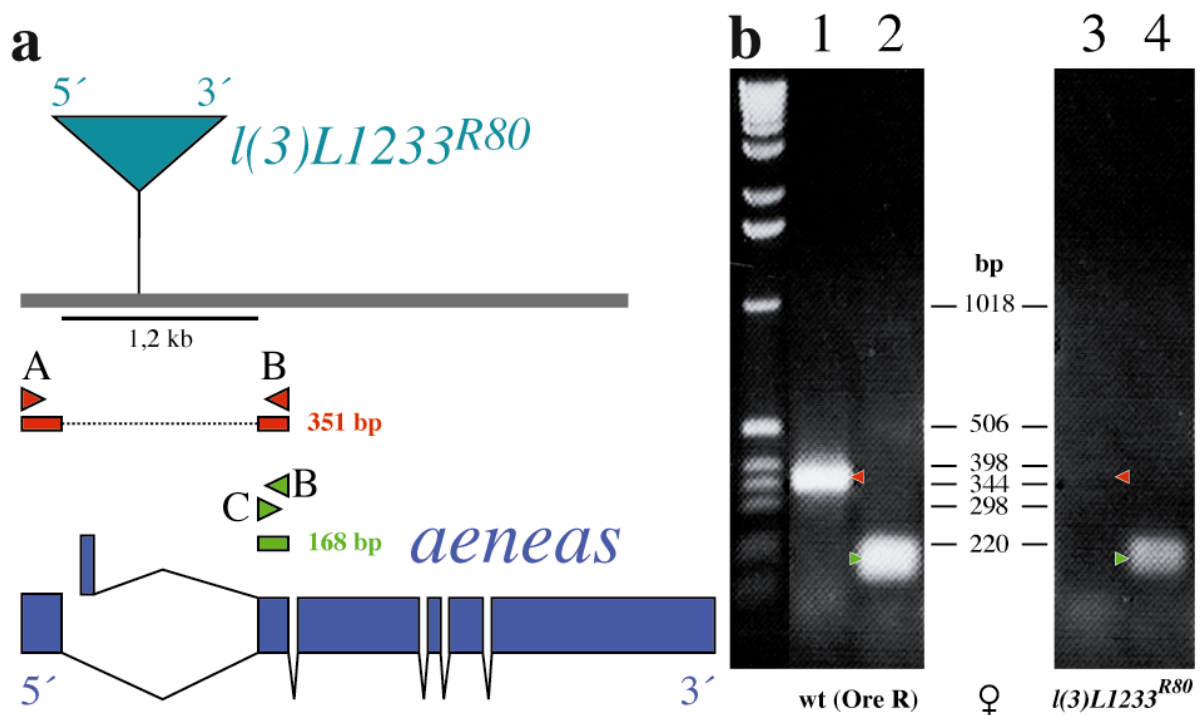
Einzelkreuzungen (F <sub>3</sub> )	keine Rekombination* (F <sub>4</sub> )	Rekombination* (F <sub>4</sub> )
	[ <i>P{lacW}l(3)LI233</i> ] homozygot letal	[ <i>P{lacW}l(3)LI233<sup>R</sup></i> ] homozygot lebensfähig
<b>500</b> (100%)	<b>494</b> (98,8%)	<b>6</b> (1,2 %)

Tab. 2-B: Rekombinations-Frequenz

\* zwischen der *P{lacW}*-Insertion und der putativen „Sekundärmutation“

## 2.8 RT-PCR Analyse der *l(3)L1233<sup>R80</sup>*-Linie

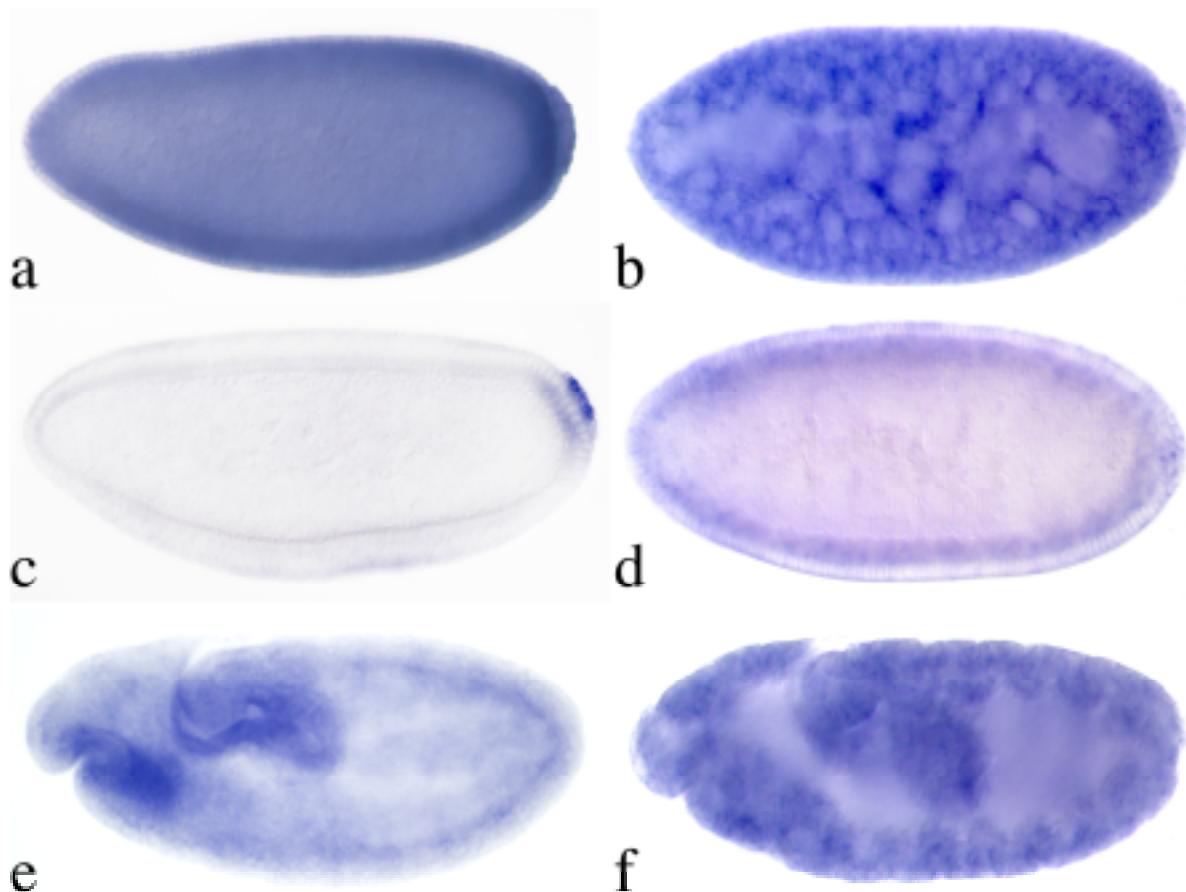
Wie schon der Northern Blot-Analyse zu entnehmen ist (2.5.3), existieren vermutlich zwei verschiedene *aeneas*-Transkripte. In einem RT-PCR-Experiment wurde untersucht, ob die Expression des *aeneas*-Gens in *l(3)L1233<sup>R80</sup>*-Fliegen, welche homozygot lebensfähig für die *P{lacW}l(3)L1233*-Insertion sind, verändert war. Dabei wurden ein 5'-Primer (A'), im 1. Exon bzw. ein 5'-Primer (C') im 2. Exon mit einem 3'-Primer (B') aus dem 2. Exon von *aeneas* eingesetzt (Abb. 2-18).



**Abb. 2-18: RT-PCR Analyse der *aeneas*-Transkripte**

- a) Die Abbildung zeigt schematisch die Intron/Exon-Struktur von *aeneas* und die korrespondierende genomische Region der *P{lacW}*-Linie *l(3)L1233<sup>R80</sup>*. Die für die RT-PCR verwendeten Primer (A', B', C') sind als Pfeile dargestellt.
- b) RT-PCR-Analyse von poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus OreR- (1, 2) bzw. *l(3)L1233<sup>R80</sup>*-Weibchen (3, 4). Spur (1 & 3): Die Primerkombination (A'+B') sollte zu einem **351 bp** langen Amplifikat führen. Spur (2 & 4): Die Primerkombination (C'+B') sollte zu einem **168 bp** langen Amplifikat führen. In Gel-Spur (3) ist kein Amplifikationsprodukt sichtbar. Das deutet darauf hin, dass das 1. Exon in dem *aeneas*-Transkript von *l(3)L1233<sup>R80</sup>*-Weibchen, im Gegensatz zu OreR-Weibchen, nicht vorhanden ist. Möglicherweise ist das „Splicing“ (Exon1-Exon2) durch die Integration von *P{lacW}l(3)L1233* gestört. Das Amplifikat aus Spur (4) stammt vermutlich von einem verkürzten alternativen Transkript (ohne Exon 1).

In der RT-PCR-Analyse von poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus OreR-Weibchen führten Kombinationen dieser drei Primer zu einem 351 bp (A' + B') und einem 168 bp langen (C' + B') PCR-Produkt. In *l(3)LI233<sup>R80</sup>* Weibchen, bei denen das *P{lacW}*-Element im 1. Intron integriert ist, konnte lediglich das 168 bp lange RT-PCR-Produkt (C' + B') nachgewiesen werden, nicht jedoch das 351 bp lange RT-PCR-Produkt (A' + B'). Eine vom 1. Exon beginnende Expression konnte, vermutlich verursacht durch die *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Insertion, nicht nachgewiesen werden. Dagegen konnte das zweite Exon amplifiziert werden. Das deutet darauf hin, dass das kürzere Transkript (2.5.3) durch einen alternativen Start vor dem zweiten Exon transkribiert wird. Die RT-PCR-Ergebnisse implizierten ferner, dass durch die *P{lacW}*-Insertion die Expression bzw. das „Splicing“ des längeren Transkripts stark verringert wurde. Das *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Allel sollte somit zumindest ein starkes hypomorphes Allel darstellen. In *in situ*-Hybridisierungen an homozygoten *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Embryonen ist das *aeneas*-Transkript stark reduziert und mit dieser Methode nicht mehr nachweisbar (Abb. 2–19).



**Abb. 2-19: Expression von *aeneas* in der homozygoten *P{lacW}*-Insertionslinie *l(3)LI233<sup>R80</sup>***

links: OreR Wildtyp Embryonen.

rechts: *l(3)LI233<sup>R80</sup> / l(3)LI233<sup>R80</sup>*

Mithilfe einer *LD30155*-cDNA-spezifischen, Digoxigenin-markierten „antisense“-RNA-Sonde wurden *in situ*-Hybridisierungen an OreR- bzw. homozygoten *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Embryonen durchgeführt. Die Embryonen befinden sich in Stadium 4 (a, b), Stadium 5 (c, d) bzw. Stadium 10 (e, f) der Embryogenese. Starke Hintergrundfärbung bei b, d, f durch längere Farbreaktion (1h).

Die beobachtete Lokalisation des maternalen Anteils des *aeneas*-Transkripts in den Polzellen (2.1.2) ließ eine Funktion in frühen Migrationsprozessen der primordialen Keimzellen von *Drosophila* vermuten, daher wurden in nachfolgenden Experimenten diese Wanderungs-Prozesse näher untersucht (2.9; 2.11).

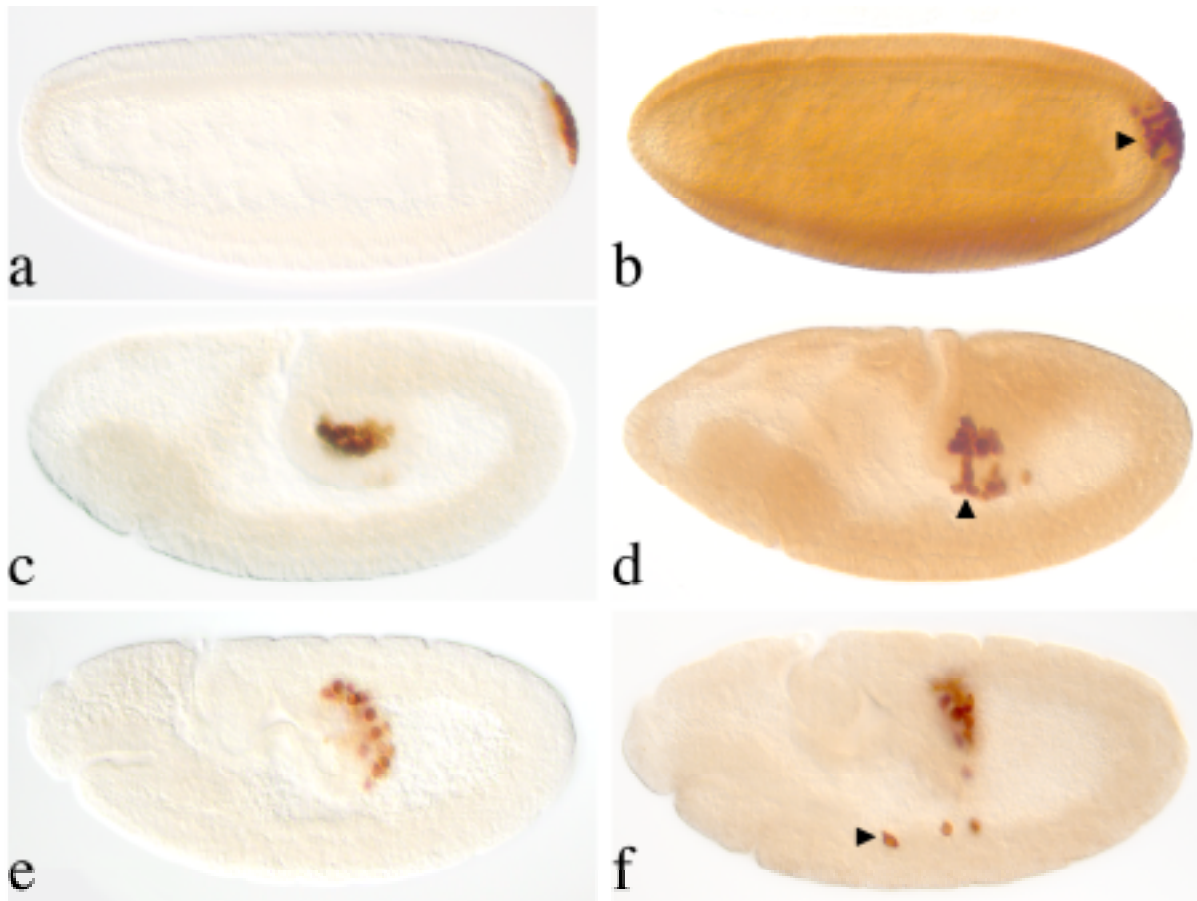
## 2.9 *aeneas* wird für die ersten Schritte der Polzellwanderung benötigt

Die Ur-Keimzellen werden ursprünglich am posterioren Pol des Embryos gebildet. Sie trennen sich früh während der Embryogenese vom Soma (Übersicht: Wiliamson und Lehmann, 1996). Die Zellularisierung der Polzellen erfolgt im Kernzyklus 10, dabei wandern einige Kerne vom Zentrum des Embryos in das Polplasma (Zalokar und Erk, 1976). Polzellen unterscheiden sich vom Soma durch eine verlangsamte Mitose, und einen transkriptionellen Ruhezustand bis zum Eintritt in das Embryonalstadium 9–10 (Kobayashi et al., 1996; Seydoux und Strome, 1999). Sie müssen im Laufe der Embryogenese durch endodermales und mesodermales Gewebe hindurch oder an diesen angelagert wandern, um schließlich mit den mesodermalen Vorläuferzellen die Gonade der Taufliege zu bilden (1.3; Boyle und DiNardo, 1995).

Das *aeneas*-Gen ist während der Embryonalentwicklung zunächst in den Polzellen selbst und später in Geweben, welche die Wanderung der Ur-Keimzellen maßgeblich beeinflussen, exprimiert (2.1.2). Die Insertion des  $P\{lacW\}l(3)L1233^{R80}$ -Elements verursacht eine hypomorphe Mutation, die lebensfähig ist. Es konnte ein homozygoter Stock etabliert werden. Die homozygot mutanten Weibchen exprimierten eine reduzierte Menge an *aeneas*-Transkript (Abb. 2-19). Die Integration des  $P\{lacW\}l(3)L1233^{R80}$ -Elements in das *aeneas*-Gen verursacht in homozygoten Embryonen ebenfalls eine Störung der Wanderung der Keimzellvorläufer. Die Wanderung der Polzellen wird in diesen Embryonen in deutlich früheren Stadien als bei allen bislang bekannten Migrationsmutanten beeinflusst.

Alle bislang bekannten Mutationen der Polzellwanderung beeinflussen die Migration frühestens während bzw. nach der Wanderung der Ur-Keimzellen durch die posteriore Mitteldarmtasche (Deshpande et al., 2001). In den mutanten Embryonen homozygoter  $l(3)L1233^{R80}$ -Fliegen durchbrechen einzelne Polzellen jedoch die Trennung von Keimbahn und Soma, und wandern schon kurz nach der Zellularisierung der somatischen Zellen in das Innere des Embryos ein. Bereits vor der Gastrulation, kurz nach der Zellularisierung (Stadium 5), durchqueren einzelne primordiale Keimzellen die unterliegende somatische Zellschicht (Abb. 2-20 b). Zudem läuft die amnioproktodeale Invagination des Darms verzögert ab.





**Abb. 2-20: Polzellen-Phänotyp der homozygoten  $P\{lacW\}$ -Insertionslinie  $l(3)L1233^{R80}$**

Die Polzellen wurden mithilfe des  $\alpha$ Vasa-Antikörpers angefärbt.

a) OreR Wildtyp Embryo

-Stadium 5-

b)  $l(3)L1233^{R80} / l(3)L1233^{R80}$

c) OreR Wildtyp Embryo

-Stadium 9-

d)  $l(3)L1233^{R80} / l(3)L1233^{R80}$

e) OreR Wildtyp Embryo

-Stadium 10-

f)  $l(3)L1233^{R80} / l(3)L1233^{R80}$

In publizierten Keimzell-Migrationsmutanten wie *wunen* (Zhang et al., 1996), *wunen 2* (Starz-Gaiano et al., 2001) oder *columbus* (Van Doren et al., 1998) ist die Wanderung der Polzellen erst nach der Durchquerung der posterioren Mitteldarmtasche beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu verlassen einige Keimzellvorläufer der homozygoten  $l(3)L1233^{R80}$ -Embryonen den Zellverband auch im Stadium 9, also vor dem regulären Durchwandern des Mitteldarms, und migrieren durch das endodermale Gewebe (Abb. 2-20 d). Nach dem transversen Passieren des Darmprimordiums in Stadium 10-11 verliert ein Teil der Polzellen dieser Embryonen den Kontakt zur Darmoberfläche. Die Keimzellen wandern danach nicht dorsal in Richtung Mesoderm, sondern in eine ventrale Position (Abb. 2-20 f).

In späteren Stadien ist die Migration der Polzellen zu den Gonaden im Vergleich dazu nur in seltenen Fällen gestört. Die Anzahl der „verirrten“ Keimzellen ist jedoch relativ gering, eine Reduktion der PKZ-Zahl in der Gonade (Stadium 13) ist daher nicht offensichtlich. Auch im Zuge der normalen Integration von Keimzellen und Mesodermzellen in die Gonaden geht ein großer Teil der Polzellen verloren, und wird degeneriert (Technau und Campos-Ortega, 1986). Da der beschriebene Migrationsphänotyp der homozygoten *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Linie nur in einem 25%igen Anteil der Embryonen auftritt, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass *l(3)LI233<sup>R80</sup>* ein hypomorphes Allel darstellt. Daher war das Ziel nachfolgender Experimente die Erzeugung einer Nullmutante des *aeneas*-Gens.

## **2.10 Remobilisierung des *P{lacW}*-Elements der *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Linie**

Um einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der homozygot lebensfähigen *P{lacW}l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Insertion und dem Migrationsphänotyp (Abb. 2-20) nachzuweisen, wurden Remobilisierungsexperimente (Bellen et al., 1989) mit dem Ziel einer Reversion des Phänotyps durchgeführt. Zugleich sollte durch eine ungenaue Exzision des Transposons eine Nullmutation des *aeneas*-Gens generiert werden.

Das *P{lacW}*-Element wurde durch Einkreuzen eines „jump starter“-Chromosoms (Robertson et al., 1988) remobilisiert. In den Nachkommen dieser Kreuzung wurde nach Fliegen gesucht, bei denen das *P{lacW}l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Element transponiert war. Diese zeichneten sich durch ihre weiße Augenfarbe aus, die aufgrund der fehlenden *w<sup>+</sup>*-Aktivität des herausgesprungenen *P{lacW}*-Elements auftrat. Diese Tiere wurden dann in Einzelkreuzungen mit Fliegen gekreuzt, die den „Balancer“ *TM3,Sb,Ser* (3. Chromosom) trugen. Aus der resultierenden Nachkommenschaft dieser Generation wurden einzelne Linien etabliert.

Wurden in den Nachkommen lediglich *l(3)LI233<sup>R80</sup> / TM3*-Tiere gefunden, so wurde angenommen, dass die Exzision des *P{lacW}*-Elements erfolgt war und durch eine Deletion flankierender genomischer Sequenzen Letalität in Homozygotie erzeugt wurde. Von diesen Fliegen wurde ein stabiler Stamm etabliert. Parallel wurden auch homozygot lebensfähige Stämme, als mögliche Revertanten, etabliert (Abb. 2-21).



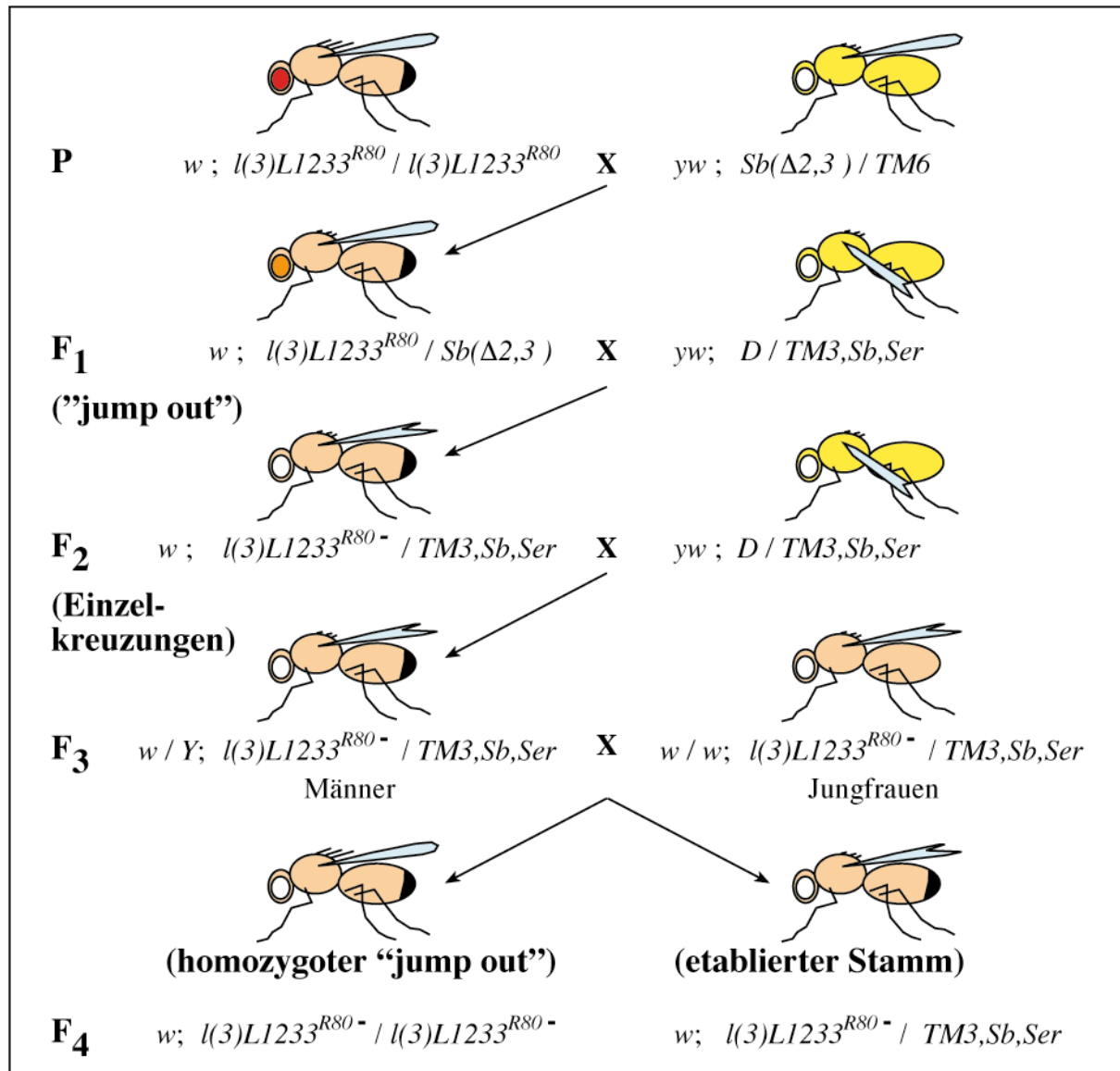


Abb. 2-21: Kreuzungsschema der *P{lacW}*-Element Exzision (*l(3)L1233<sup>R80</sup>*)

- P)** Parentale Generation. Kreuzung der Linie des zu mobilisierenden *P{lacW}*-Elements mit einer „jump starter“-Linie.
- F1)** Kreuzung von Tieren, welche die *P{lacW}*-Element-Insertion und das Transposase-Gen tragen, mit Fliegen mit einem „Balancer“-Chromosom.
- F2)** Kreuzung von Nachkommen aus der F1-Kreuzung, in denen eine *P{lacW}*-Element Remobilisierung stattgefunden hatte, mit „Balancer“-Fliegen.
- F3)** Etablierung von unabhängigen Fliegenlinien und Test auf Letalität von homozygoten „jump out“-Fliegen.

*Sb* = *Stubble*; *Ser* = *Serrate*; *D* = *Dichaete*; *w* = *white*; *y* = *yellow*; *TM3* = „Balancer“ (3. Chr.)

$w ; l(3)L1233^{R80} / l(3)L1233^{R80} = P\{lacW\}l(3)L1233$  (nach Rekombination homozygot lebensfähig)

$l(3)L1233^{R80-} = l(3)L1233^{R80}$  (mit deletiertem *w*-Gen)

Diese Stämme wurden dann mittels PCR dahingehend überprüft, ob das ganze  $P\{lacW\}$ -Element verloren worden war oder ob Teile des  $P\{lacW\}$ -Elements immer noch im Genom integriert waren. Außerdem sollte überprüft werden, ob es zu einer ungenauen Exzision und einer damit verbundenen Deletion gekommen war. Dazu wurden ein 5'-Primer (**A**) im 1. Exon mit 3'-Primern aus dem 2. Exon (**B**) bzw. aus dem 3. Exon (**C**) von *aeneas*, sowie ein, zu den „inverted repeats“ des  $P\{lacW\}$ -Elements komplementäres, Oligonukleotid (**P**-Primer) eingesetzt (Abb. 2-22). In der PCR-Analyse der genomischen DNA der  $P\{lacW\}$ -Linie  $l(3)L1233^{R80}$  führten die verschiedenen Primerkombinationen zu 636 bp (**A+P**), 902 bp (**P+B**) und 1.603 bp (**P+C**) langen PCR-Produkten. Eine genaue oder ungenaue Exzision des  $P\{lacW\}$ -Elements führte zur Amplifikation von PCR-Produkten anderer Längen.

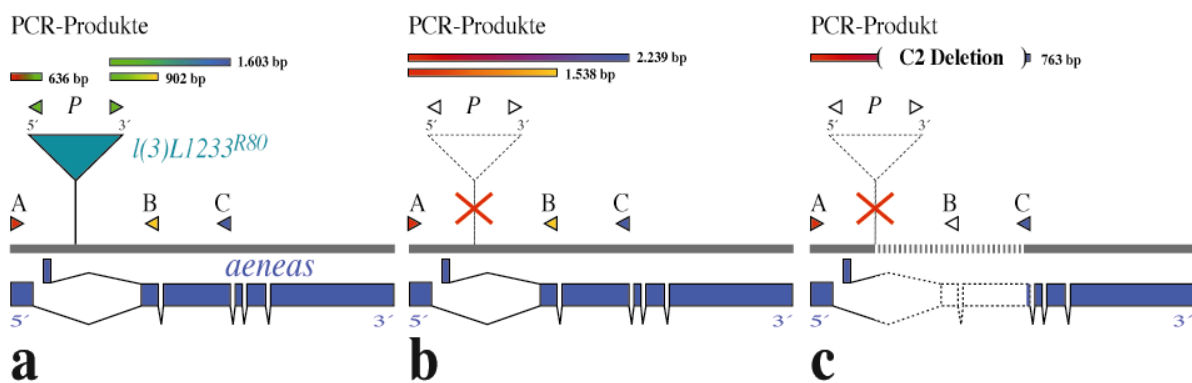


Abb. 2-22: Genomische PCR-Analyse der Exzisions-Linien

- Die Abbildung zeigt die genomische Region der Linie  $P\{lacW\}l(3)L1233^{R80}$ . Die für die genomische PCR verwendeten Primer (**A**, **B**, **C** und **P**) sind als farbige Pfeile dargestellt. Die Primerkombinationen führten zu PCR- Amplifikaten folgender Länge: (**A+P**) = **636 bp** ; (**P+B**) = **902 bp** ; (**P+C**) = **1.603 bp**. Die PCR-Produkte der Primerkombinationen (**A+B** ; **A+C**) wurden aufgrund der gewählten PCR-Parameter nicht amplifiziert (**4.1.12**).
- Die Abbildung zeigt die genomische Region einer Exzisions-Linie in der das  $P\{lacW\}$ -Element remobilisiert und exakt exzidiert war. Die Bindungsstelle des Primers (**P**) war folglich nicht mehr existent. Die Primerkombinationen führten zu PCR-Amplifikaten folgender Länge: (**A+B**) = **1.538 bp** ; (**A+C**) = **2.239 bp**
- Dargestellt ist die genomische Region der Exzisions-Linie  $\Delta P\{lacW\} l(3)L1233^{R80-C2}$ . In dieser Linie war das  $P\{lacW\}$ -Element remobilisiert und es kam zu einer ungenauen Exzision, verbunden mit einer 1.476 bp großen Deletion im *aeneas*-Lokus. Die Bindungsstelle des Primers (**P**) aus dem  $P\{lacW\}$ -Element und die genomische Primer-Bindungsstelle (**B**) waren hier nicht mehr vorhanden. Die Primerkombination (**A+C**) führte zu einem PCR-Amplifikat der Länge: **763 bp**

In dieser PCR-Analyse konnte jedoch kein Kausalzusammenhang des Auftretens von homozygot letalen „jump out“-Linien und der Remobilisierung des  $l(3)LI233^{R80}$ -Elements gefunden werden. Sowohl homozygot lebensfähige, als auch letale Remobilisierungslinien wiesen ungenaue Exzisionen des  $P\{lacW\}$ -Elements auf. Ebenso konnten homozygot letale Linien erzeugt werden, in denen das  $l(3)LI233^{R80}$ -Element unverändert im ursprünglichen Insertionsort saß. Diese Ergebnisse deuten auf eine sekundäre Reintegration oder eine andere Mutation hin, welche zur Letalität vieler Linien führte.

Eine der homozygot semiletalen „jump out“-Linien zeigte in der PCR-Analyse ein verändertes Bandenmuster, was auf eine Deletion im *aeneas*-Gen hinwies. Nach Klonierung des verkürzten Amplifikationsprodukts und dessen Sequenzierung konnte verifiziert werden, dass Teile des *aeneas*-Gens (*CG14648*) deletiert worden waren. Die 1.476 bp große Deletion betrifft Teile des 1. Introns, das 2. Exon, das 2. Intron und einen Großteil des 3. Exons des *aeneas*-Gens (Abb. 2-23). Diese Deletionslinie wird nachfolgend als  $\Delta l(3)LI233^{R80-C2}$  bezeichnet.

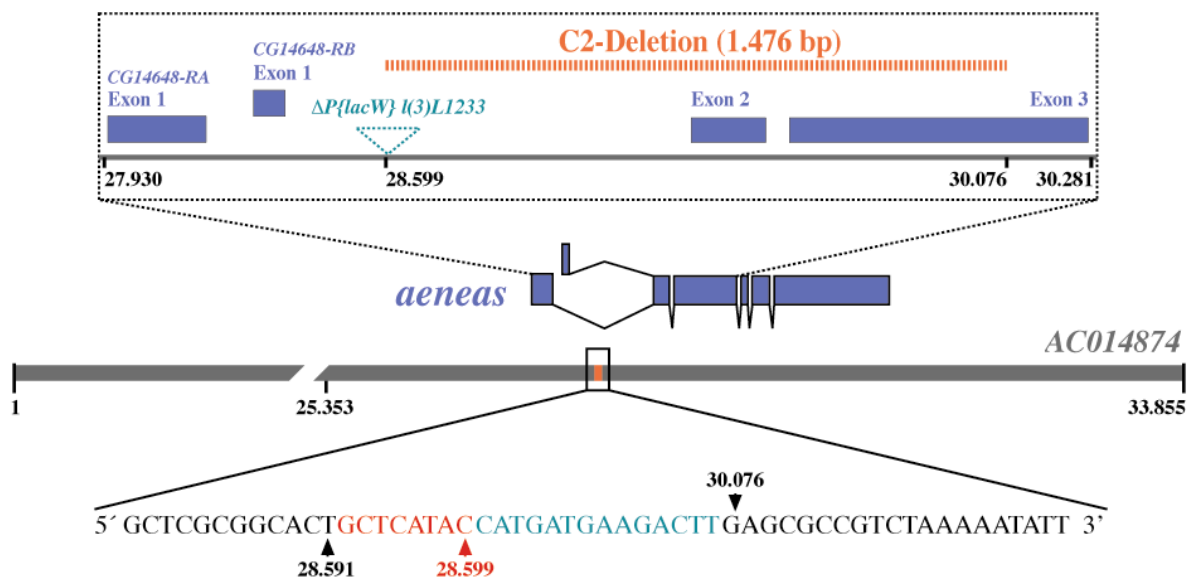


Abb. 2-23: genomische Organisation des *aeneas*-Lokus ( jump out-Linie  $\Delta l(3)LI233^{R80-C2}$  )

Die Abbildung zeigt schematisch den genomischen Bereich, in dem Teile des *aeneas*-Gens deletiert worden sind. Dargestellt ist der genomische Celera-Klon *AC014874*. Der ursprüngliche Integrationsort des, durch ungenaue Exzision entfernten,  $P\{lacW\}$ -Elements wird als  $\Delta P\{lacW\} l(3)LI233^{R80}$  bezeichnet. Ebenso ist die relative Lage der ungekürzten *aeneas*-Transkripte und ihrer Intron/Exon-Struktur illustriert. In **schwarz** ist der *aeneas*-Sequenzanteil (1. Intron & 3. Exon) dargestellt.

In **rot** ist die ehemalige Acht-Basenpaar-Duplikation zu sehen (siehe Abb. 2.12)

In **grün** ist  $P\{lacW\} l(3)LI233^{R80}$  Restsequenz (14 bp) gezeigt.

In **orange** ist die Deletion C2 (1.476 bp) in der Linie  $\Delta l(3)LI233^{R80-C2}$  dargestellt.

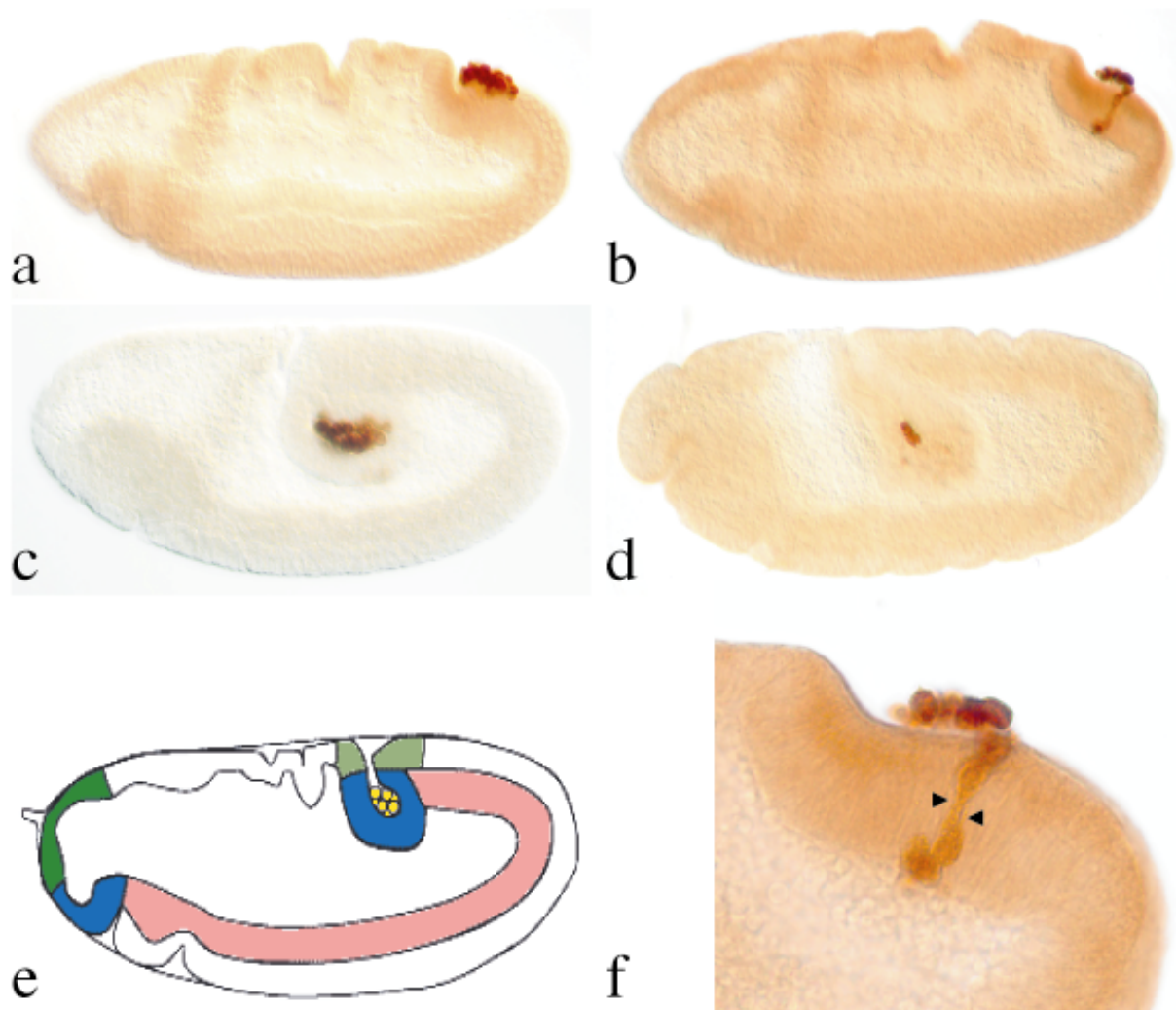
## 2.11 Gestörte Polzellwanderung in $\Delta l(3)l1233^{R80-C2} / Df(3R)Z1$ -Embryonen

Um den Einfluss einer möglichen Sekundärmutation zu umgehen (2.10) und eine Verstärkung des Phänotyps von homozygoten  $l(3)l1233^{R80}$ -Embryonen zu erhalten (2.9), wurde die Deletionslinie  $\Delta l(3)l1233^{R80-C2}$  mit der schon beschriebenen (2.7) Defizienz  $Df(3R)Z1$  gekreuzt. Da diese Deletionslinie über der  $Df(3R)Z1$ -Defizienz lebensfähige Nachkommen lieferte, konnten die transheterozygote Linie:  $\Delta l(3)l1233^{R80-C2} / Df(3R)Z1$  erhalten werden.

Von den in einem 50%igen Anteil vorkommenden  $\Delta l(3)l1233^{R80-C2} / Df(3R)Z1$ -Nachkommen dieser transheterozygoten Linie zeigen etwa die Hälfte einen Polzellenphänotyp. Wie bei der homozygoten  $P\{lacW\}$ -Linie (2.9) lösen sich, auch bei diesem Genotyp, einzelne Polzellen in ungewöhnlich frühen Embryonalstadien (Stadium 5-6) vom Zellverband und wandern durch die unterliegende somatischen Zellschicht (Abb. 2-24 a). Interessanter Weise sind beim Durchtritt der Polzellen durch das somatische Gewebe filopodienartige Auswüchse der Keimzellen zu beobachten (Abb. 2-24 e, Pfeile). Auffallend oft war auch die Zahl der Keimzellen schon vor deren Invagination mit dem Darm stark reduziert (Abb. 2-24 d). Der Phänotyp erschien im Vergleich zu den homozygoten  $l(3)l1233^{R80}$ -Embryonen leicht verstärkt.

Mit dieser potenziellen Nullmutation  $\Delta l(3)l1233^{R80-C2}$  konnte somit nicht nur eine Verstärkung der Penetranz, sondern auch eine schwache Verstärkung des Phänotyps der homozygoten  $l(3)l1233^{R80}$ -Linie erhalten werden. Eine mögliche Erklärung für die unvollständige Penetranz der beiden *aeneas*-Allele könnte in einer funktionellen Redundanz des *aeneas*-Gens liegen. Ein Kandidat für ein in diesem Prozess möglicherweise redundant wirkendes Gen ist das zweite vorhergesagte 5-FTHF-Cyclo-Ligase-Gen (*CG11079*) aus *Drosophila* (2.1.1; Abb. 2-15). In weiterführenden Analysen sollte die endogene Expression dieses Gens untersucht werden. Eine Überlappung der Expressionsdomänen der beiden Gene wäre ein erster Hinweis auf ein Zusammenwirken der putativen Enzyme.

Ein Beispiel für derart redundant wirkende Gene, die die Polzellwanderung beeinflussen sind *wunen* und *wunen 2* (Starz-Gaiano et al., 2001). Eine Mutation in nur einem dieser beiden Gene führt zu keinem Migrationsphänotyp. Der wichtige Prozess der Keimzellwanderung ist vermutlich durch die Funktion mehrerer redundant wirkender Faktoren abgesichert. Der Ausfall von einem dieser Gene führt also nicht zur Sterilität der Fliegen, infolge einer ungenauen Positionierung aller Keimzellen. Wahrscheinlich beeinflusst die *aeneas*-Funktion einen regulatorischen Schritt in diesem so überlebenswichtigen Prozess.



**Abb. 2-24: Gestörte Polzellwanderung in  $\Delta l(3)l1233^{R80-C2} / Df(3R)Z1$  Embryonen**

Die „jump out“-Linie  $\Delta l(3)l1233^{R80-C2}$  wurde mit der Defizienzlinie  $Df(3R)Z1$ , die das *aeneas*-Gen deletiert, gekreuzt. Die Polzellen wurden mithilfe des  $\alpha$ Vasa-Antikörpers angefärbt.

- a) OreR Wildtyp Embryo (Stadium 6)
- b)  $\Delta l(3)l1233^{R80-C2} / Df(3R)Z1$  (Stadium 6): Einzelne Polzellen verlassen den Zellverband und wandern durch die unterliegende Zellschicht.
- c) OreR Wildtyp Embryo (Stadium 9)
- d)  $\Delta l(3)l1233^{R80-C2} / Df(3R)Z1$  (Stadium 9): Die Anzahl der Polzellen, die in der amnioproktodealen Invagination mit dem Darm einwandert, ist reduziert.
- e) Schema der amnioproktodealen Invagination (Wildtyp):  
mit dem posterioren Mitteldarm (blau)  
werden die Polzellen (gelb) in das Innere des Embryos verlagert.
- f) Ausschnittsvergrößerung aus (b) (Pfeile weisen auf „fehlgeleitete“ Polzellen mit Filopodien)

### 3 Diskussion

Mit 4000 *P{EP}*-Element-Insertionslinien (Rørth et al., 1998) wurde ein Fehlexpressions-„Screen“ durchgeführt, dessen Ziel es war Gene zu identifizieren, welche an der gerichteten Zellmigration bzw. am gerichteten Zellwachstum beteiligt sind. Bei ca. einem Prozent der untersuchten Embryonen konnten Muskelphänotypen beobachtet werden, die mit Letalität einhergingen (2.2). Ein Teil dieser so identifizierten Gene war bereits für seine Funktion bei der Muskelentwicklung bekannt (3.5; BDGP). Dieses Ergebnis belegt, dass der für die Fragestellung gewählte experimentelle Ansatz erfolgreich angewendet werden konnte und zu adäquaten Ergebnissen führt („proof of concept“). Aufgrund der häufigen Mehrfachverwendung von Proteinen bei Zellmigrationsprozessen in unterschiedlichen Geweben konnten auch Gene identifiziert werden, die normalerweise nicht in Muskeln exprimiert werden, welche aber bei der Fehlexpression mit Faktoren und Prozessen der Muskelentwicklung in Wechselwirkung traten. Dies deutet auf eine Funktion dieser Gene in einem anderen Gewebe als dem „target“-Organ des „Screens“ hin und erlaubt Migrations- bzw. Zell-Zell-Erkennungsprozesse im eigentlichen Zielgewebe dieser Faktoren zu untersuchen.

Ein Beispiel für ein derartiges Gen ist *aeneas*. Das *aeneas*-Gen spielt bei der gerichteten Wanderung der Polzellen (Starz-Gaiano and Lehmann, 2001) auf ihrem Weg durch den Embryo zum Entstehungsort der Gonade eine wichtige Rolle. Eine *P*-Element-Insertion im ersten Intron des Gens bewirkt bei etwa einem Drittel der maternal und zygotisch mutanten, homozygoten Embryonen einen Migrationsphänotyp der Polzellen (2.9). Der beobachtete Phänotyp zeichnet sich im Gegensatz zu anderen Migrationsmutanten (1.3.1) durch eine außerordentlich frühe Störung der Keimzellwanderung aus. Die fehlgeleiteten Polzellen unterlaufen vermutlich zu einem späteren Zeitpunkt Apoptose oder werden in einem Gewebe außerhalb der Gonaden eingelagert. Die unvollständige Penetranz des Phänotyps deutet auf eine Redundanz mit anderen Genfunktionen hin. Diese Art der Absicherung von biologischen Prozessen ist bereits für andere Gene bekannt (1.3.1).

#### 3.1 Der modulare Fehlexpressions-„Screen“

Das gerichtete Wachstum der Myotuben und deren spätere Anheftung an die Epidermis wird durch die Apodemzellen beeinflusst (Vorbrüggen und Jäckle, 1997; Becker et al., 1997). Eine in diesen Zellen induzierte Fehlexpression von endogenen Genen sollte also das Wachstum der Myotuben beeinflussen, sofern diese Gene das Potenzial haben, das gerichtete Wachstum der Muskelvorläufer zu beeinflussen (2.1, Abb. 2-1). Diese experimentelle Vorgehensweise sollte im Besonderen für Gene wirksam sein, die für richtungsgebende, Myotuben-spezifische Signalmoleküle kodieren. Zur Unterscheidung von attraktiven bzw. repulsiven Faktoren

wurden zwei Gal4–Treiberlinien verwendet (2.1). Eine Annahme war, dass Kandidaten-Gene aus dem Fehlexpressions-„Screen“ bevorzugt in den Muskelanheftungsstellen oder in wachsenden Myotuben selbst exprimiert sind. Allerdings birgt die Fehlexpression eines Gens in einem spezifischen Zell- bzw. Gewebetyp das Risiko der Erzeugung von artifiziellen Phänotypen, selbst wenn das identifizierte Gen keine endogene Funktion im vorgesehenen Kontext aufweist (Kraut et al., 2001). Der Fehlexpressions-Phänotyp definiert also nicht *per se* die normale Funktion eines Gens. Vielmehr liefert er eine Methode zur schnellen Identifizierung von Genen, die ein Potenzial für bestimmte biologische Aktivitäten besitzen.

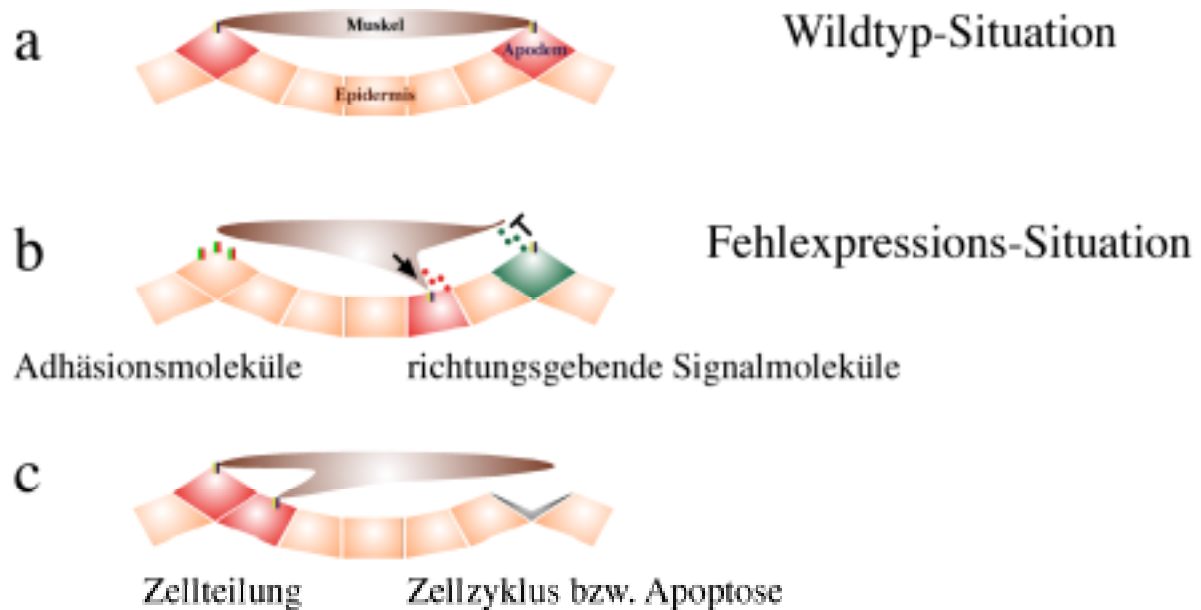
Beispiele für Gene, die beim gerichteten Myotubenwachstum involviert sind, sind im Abschnitt 1.1.4 aufgeführt. In dem beschriebenen „Screen“ konnten die genannten Kontrollgene, welche einen Hinweis auf die spezifische Wirksamkeit der Vorgehensweise liefern würden, nicht identifiziert werden. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da mit einer Anzahl von 4.000 *P{EP}*-Insertionslinien nur ein geringer Anteil des *Drosophila*-Genoms einer Fehlexpression zugänglich gemacht wurde. Zusätzlich ist die korrekte Orientierung des *P{EP}*-Elements entscheidend. Statistisch erlauben nur 50% aller Integrationen die Induktion eines 3' zur Insertion liegenden Gens (Rørth et al., 1998). Durch die Integration des *P{EP}*-Elements in einem Intron bzw. in den kodierenden Bereichen eines Gens können bei der Fehlexpression verkürzte Transkripte entstehen (Kraut et al., 2001). Die resultierenden Protein-Fragmente können entweder die Wildtyp-Funktion oder eine dominant-negative Wirkung ausüben (Übersicht: Adams und Sekelsky, 2002).

### **3.2 Die Fehlexpressions-Situation**

Unter den Kandidaten-Genen finden sich wenige, die für richtungsgebende Signalmoleküle kodieren. Eine Erklärung dafür ist, dass das beobachtete, veränderte Muskelmuster auch durch ein Absterben der Apodemzellen oder eine veränderte Zellteilung hervorgerufen werden kann. Verschiedene Mechanismen, die eine Störung des Muskelmusters bewirken können, sind in Abb. 3-1 dargestellt. Die Induktion von Signalmolekülen und Adhäsionsmolekülen sollte in der Fehlexpressions-Situation zu Muskelphänotypen führen (Abb. 3-1 b). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Fehlexpression von entsprechenden Faktoren gestörte Zellzyklus- oder Zellteilungsprozesse auslöst, und die daraus folgende Apoptose bzw. Überproliferation von Apodemzellen eine Störung der Muskulatur hervorruft (Abb. 3-1 c). In der Tat konnten mit *Syndecan* (Spring et al., 1994) und *Toll* (Anderson et al., 1985) in dem „Screen“ Gene identifiziert werden, von denen eine Funktion bei der Zelladhäsion bekannt war. Auch Faktoren des Zellzyklus bzw. der Zellteilung, wie z.B. *Cycline A* und *cycline B3* (Lehner und O'Farrell, 1989; Knoblich und Lehner, 1993) wurden



identifiziert (siehe auch Tab. 2-A). Die Kandidaten-Gene sollten nun auf eine mögliche endogene Beteiligung an diesen Prozessen untersucht werden.



**Abb. 3-1: Erklärungsmöglichkeiten für die Entstehung eines Muskelphänotyps**

- a) Wildtyp-Situation
- b) Fehlexpression in den segmentalen Apodemvorläuferzellen und in einer Reihe zwischenliegender, epidermaler Zellen (Treiberlinie: *sr239ΔPanGal4*).  
Links: Kompetitive Adhäsionsmoleküle an der Segmentgrenze bzw. Expression von Muskel-spezifischen Adhäsionsmolekülen in den intrasegmentalen Zellen (nicht dargestellt) führt zu fehlender bzw. falscher Anheftung der Muskeln.  
Rechts: Abstoßende Faktoren an der Segmentgrenze bzw. anziehende Signale in den intrasegmentalen Zellen führen zu fehlgeleiteten Muskeln.
- c) Links: Verstärkte Zellteilung der Apodeme an der Segmentgrenze führt zu artifiziellen Muskelanheftungstellen.  
Rechts: Veränderungen im Zellzyklus bzw. Apoptose der Zellen an der Segmentgrenze führen zu fehlenden Muskelanheftungstellen (Apodeme).

### 3.3 Molekulare Charakterisierung der identifizierten Gene

Die Klassifizierung der beobachteten Muskelphänotypen gestaltete sich schwierig. Sie umschlossen so unterschiedliche Erscheinungsformen, wie eine gestörte Wegfindung, morphologische Veränderungen, bzw. das Fehlen oder eine erhöhte Anzahl von Myotuben. Oftmals zeigten die betroffenen Embryonen jedoch multiple Phänotypen, die mehrere dieser Klassen abdeckten. Auch wurden in unterschiedlichen Segmenten eines Embryos verschiedene Abstufungen der Phänotypen und mehrere Klassen gefunden. Daher wurde eine Sequenz-spezifische Unterteilung der „Screen“-Kandidaten gewählt (Kraut et al., 2001).



Die meisten der 70 *P{EP}*-Element-Kandidaten (80%) wiesen eine Orientierung auf, welche die Transkription der Gal4-getriebenen „sense“-RNA eines in Nachbarschaft liegenden Gens ermöglichte. Einige *P{EP}*-Elemente (15%) waren mit einer entgegengesetzten Orientierung inseriert und führten vermutlich durch eine induzierte „antisense“-RNA Produktion zu einem „loss-of-function“-Muskelphänotyp (Rørth et al., 1998). Nur etwa 5% der *P{EP}*-Kandidaten waren nicht in der Nähe eines identifizierbaren Kandidaten-Gens inseriert. Hierbei kann das Vorliegen von bisher unbekannten „Splice“-Varianten und somit die Expression von Genen nicht ausgeschlossen werden, welche deutlich entfernt vom *P{EP}*-Element liegen. Ebenso existieren vermutlich Gene, die noch nicht annotiert werden konnten. In beiden Fällen muss auf die Identifizierung neuer EST-Sequenzen gewartet werden, um diese Annahmen zu verifizieren. Den 70 *P{EP}*-Element-Insertionen konnten 64 verschiedene Genfunktionen zugewiesen werden.

22 *P{EP}*-Element-Kandidaten waren in oder angrenzend zu „bekannten“ Genen inseriert. Als „bekannt“ wurden solche Gene definiert, für die mutante Allele publiziert sind. Ferner wurden zusätzlich 42 „neue“ Gene identifiziert, für die anhand von Sequenzhomologien eine spezifische Funktion des Proteins erwartet werden kann (Tab. 2A, 2.2.1). Bei vier der „bekannten“ Gene war eine Beteiligung bei der Muskelentwicklung bereits diskutiert worden (3.5). Die restlichen *P{EP}*-Insertionen konnten keinen Genfunktionen zugeordnet werden.

### 3.4 Funktionelle Gruppierung der identifizierten Gene

PFG	Funktion	Anzahl	Beispiele in (3.4)
1	Zellzyklus und -teilung	4 (3 bekannte Gene)	<i>CycA</i>
2	Enzyme / Biosynthese	13 (4 bekannte Gene)	<i>GH02901; ifc; CG17292; sfl; guf</i>
3	Kinasen	4 (1 bekanntes Gen)	<i>CG10535</i>
4	Protein-Transport	3 (2 bekannte Gene)	<i>chic</i>
5	Protein-Degradierung	5 (2 bekannte Gene)	<i>Uba1</i>
6	Carrier	3 (0 bekannte Gene)	-
7	Transkriptions Regulatoren	5 (4 bekannte Gene)	<i>esg; shn</i>
8	RNA-bindende Proteine	2 (1 bekanntes Gen)	-
9	Plasmamembranproteine / Rezeptoren	7 (4 bekannte Gene)	<i>Sdc; GNB3; Tl</i>
10	Diverse	22 (1 bekanntes Gen)	-

Tab. 3-A: Proteinfunktionsgruppen [PFG]

Alle Gene wurden grob in Funktionsgruppen eingeteilt (2.2.1; Tab. 2-A bzw. 3.4 Tab. 3-A) und somit spezifischen Molekülklassen zugeordnet. Die vorgenommene Klassifizierung der identifizierten Kandidaten-Gene soll als Rahmen dienen, innerhalb dessen ihre Wirkungsweise bei der Muskelentwicklung diskutiert wird.

**Proteinfunktionsgruppe 1:** (Zellzyklus und Zellteilung)

Neben einer artifiziellen Einwirkung auf das gerichtete Muskelwachstum (Abb. 4-1), ist eine Mitwirkung von Faktoren dieser Proteinfunktionsgruppe [PFG] beim Teilungsprozess der Apodemvorläuferzellen denkbar. *CyclinA* (*CycA*) (Lehner und O'Farrell, 1989) ist ein Kandidat der PFG 1, seine Fehlexpression führt zu einem defekten Muskelmuster. Cycline sind regulatorische Proteine, die mit Proteinkinasen der *Cdk*-Familie assoziieren, deren Aktivierung ermöglichen und damit die Zellteilung einleiten (Übersicht: Edgar und Orr-Weaver, 2001). Der kontrollierte Abbau von *CyclinA* wird von *dally* (Nakato et al., 2002) beeinflusst, welches für ein *Drosophila*-Proteoglykan kodiert. In dem „Screen“ konnte ebenfalls ein Mitglied dieser Proteinklasse identifiziert werden [PFG 9].

**Proteinfunktionsgruppe 2:** (Enzyme / Biosyntheseprozesse)

Interessanterweise sind einige Faktoren des Lipid-Metabolismus unter den Kandidaten-Genen. So kodiert *BcDNA:GH02901* für eine Acyl-CoA-Synthetase, *CG17292* für eine Triazylglyzerol-Lipase (BDGP Project Members, 2000) und *infertile crescent* (*ifc*) (Endo et al., 1996) für eine Stearyl-CoA-Desaturase. In den letzten Jahren konnten für einige Enzyme, die eine Rolle beim Fettstoffwechsel spielen, Funktionen bei der gerichteten Zellmigration nachgewiesen werden (1.3.1). Eine Beiteiligung der Kandidaten-Gene an einem analogen Prozess ist daher vorstellbar.

Das *sulfateless*-Gen (*sfl*), ein weiteres Mitglied der PFG 2, ist für die Modifikation von Proteoglykanen, wie *dally* notwendig (Lin und Perrimon, 1999). Diese Modifikation ist essenziell für die Funktion der *hedgehog*-, *wg*- und FGF-Signalwege (Toyoda et al., 2000). In homozygoten Embryonen, in denen maternales und zygotisches *sfl*-Genprodukt fehlt, ist die Mesoderm-Migration gestört (Perrimon et al., 1996). Eine Funktion von *sulfateless* beim gerichteten Muskelwachstum erscheint möglich, da auch das Proteoglykan Syndecan [PFG 9] (Spring et al., 1994; 3.5) in diesem Fehlexpressions-„Screen“ identifiziert wurde. Eine posttranslationale Modifikation von Syndecan durch Sulfateless ist jedoch nicht dokumentiert. Die Ergebnisse dieses und ähnlicher Fehlexpressions-„Screens“ (Starz-Gaiano et al., 2001; Kraut et al., 2001) deuten auf die Wichtigkeit von Enzymen bei Migrationsprozessen hin. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Fehlexpression einiger dieser Enzyme zum Absterben der betroffenen Zellen führt. Eine artifiziell ausgelöste Apoptose der Apodemzellen würde in dem dargestellten „Screen“ ebenso zu einem gestörten Muskelmuster führen (Abb. 3-1c).

### Proteinfunktionsgruppe 3: (Kinasen)

Das identifizierte Kandidaten-Gen *CG10535* (BDGP Project Members, 2000) zeigt Homologie zum „IKK-complex-associated protein“ (IKKAP), einem strukturellen Protein der IκB-Kinase (Cohen et al. 1998). Die IκB-Kinase ist ein Bestandteil des NF-κB-Signaltransduktionswegs (Übersicht: Silvermann und Maniatis, 2001). Diese Transduktionskaskade spielt bei verschiedenen zellulären Prozessen, einschließlich morphogenetischen, eine wichtige Rolle (Huang et al., 1997). Sie könnte auch beim gerichteten Wachstum der Myotuben beteiligt sein, da andere Faktoren dieses Signalwegs, wie z.B. der Rezeptor *Toll* [PFG 9] (Khush et al., 2001; 3.5) und der Mustererkennungsrezeptor *GGBP3* [PFG 9] (Kim et al., 2000) im „Screen“ identifiziert werden konnten.

### Proteinfunktionsgruppe 4: (Protein-Transport)

Das *chickadee*-Gen (*chic*) [PFG 4] kodiert für ein *Drosophila*-Profilin, welches bei intrazellulären, zytoplasmatischen Transportprozessen involviert ist (Cooley et al., 1992). Chickadee ist an der EGF-Signaltransduktion (Doberstein et al., 1994) und an der Migration der „border cells“ während der Oogenese (Verheyen und Cooley, 1994) beteiligt. Eine analoge Funktion beim gerichteten Myotubenwachstum steht nun einer detaillierten Untersuchung offen. So übt der EGF-Rezeptor (*Egfr*) (Übersicht: Bogdan und Klämbt, 2001) z.B. eine essenzielle Rolle bei der Muskelanheftung an die Apodeme aus. Die migrierenden Muskeln binden dabei den EGF-Liganden Vein (Yarnitzky et al., 1997).

### Proteinfunktionsgruppe 5: (Protein-Degradierung)

Diese Kandidaten könnten beim Abbau von Signaltransduktionsfaktoren beteiligt sein. Ein Beispiel für eine derartige Steuerung von Migrationsprozessen ist die spezifische Degradierung des *slow border cells* (*slbo*)-Proteins (Rørth et al., 2000). Der Transkriptionsfaktor Slbo (Montell et al., 1992) spielt, ähnlich wie das erwähnte Chickadee-Protein [PFG 4], bei der Wanderung der „border cells“ eine Rolle (Montell et al., 1992). Eine konstante Proteinaktivität wird in den „border cells“ durch die Steuerung des metabolischen Umsatzes von Slbo erreicht. Durch die spezifische Bindung von Tribbles (Seher und Leptin, 2000) an das Slbo-Protein wird dieses mittels Ubiquitinierung abgebaut. Die Ubp64 ubiquitin hydrolase wirkt antagonistisch als ein Stabilisator des Slbo-Proteins (Rørth et al., 2000).

Das *Ubiquitin activating enzyme1*-Gen (*Uba1*) [PFG 5] ist an der Protein-Degradierung beteiligt (Birchler et al., 2001). Es wurde ebenfalls in dem Fehlexpressions-„Screen“ (Kraut et al., 2001) identifiziert. In dem hier beschriebenen „Screen“ wurden zusätzlich zwei Proteine identifiziert, die eine F-Box Domäne enthalten (Tab. 2–A). F-Box-Proteine dienen als spezifische Adapter, die an abzubauende Proteine binden und deren Ubiquitinierung ermöglichen (Übersicht: Kipreos und Pagano, 2000). Sie beeinflussen so verschiedene Prozesse, wie den Zellzyklus, die Immunantwort, Signalkaskaden und verschiedene

Entwicklungsschritte, durch die Ubiquitinierung von Proteinen, wie Cyclin, I $\kappa$ B $\alpha$  und Catenin (Schulman et al., 2000). Ferner wurde sowohl ein Ubiquitin-konjugierender, als auch ein Ubiquitin-ligierender Faktor identifiziert (Tab. 2–A). Diese Häufung von Proteinen, die an der Ubiquitinierung beteiligt sind, deutet auf eine zentrale Funktion der spezifischen Protein-Degradierung bei der Muskelentwicklung hin.

**Proteinfunktionsgruppe 7:** (Transkriptions Regulatoren)

Der Transkriptionsfaktor Escargot (Fuse et al., 1994) [PFG 7] beeinflusst Prozesse der Endoreplikation im Zellzyklus (Übersicht: Edgar und Orr-Weaver, 2001). Das *escargot*-Gen (*esg*) spielt ebenfalls bei der Entwicklung der Tracheen eine Rolle (Tanaka-Matakatsu et al., 1996) und ist bei der Zelladhäsion bzw. der Motilität von Zellen involviert (Yin und Frasch, 1998). Eine Funktion bei der Muskelentwicklung konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden.

**Proteinfunktionsgruppe 9:** (Plasmamembranproteine / Rezeptoren)

Diese Gene waren von besonderem Interesse, da sie nahe legen, dass Zellkontakte für die Etablierung des Muskelmusters eine Rolle spielen. In dem „Screen“ konnten zwei unabhängige *P{EP}*-Insertionen in dem *GNBP3*-Gen [PFG 9], welches für das Gram negative bacteria binding protein 3 kodiert, identifiziert werden. Dieser Mustererkennungsrezeptor kann an Lipopolysaccharide binden (Kim et al., 2000). Neben seiner Funktion bei der Bakterienabwehr ist eine *Toll*-analoge Beteiligung bei der endogenen Zellerkennung bzw. Adhäsion denkbar (3.5). Zwei weitere Kandidaten-Gene der [PFG 9], *Syndecan* (*Sdc*) und *Toll* (*Tl*), werden nachfolgend näher betrachtet (3.5).

Die Homologie eines Kandidaten-Gens zu bekannten Genfunktionen lässt nicht generell auf eine Beteiligung dieses Kandidaten in einem ähnlichen Prozess schließen. Die in dem Fehlexpressions-„Screen“ identifizierten Gene lassen sich jedoch einigen interessanten Molekülklassen zuordnen, die potenziell für Migrationsprozesse von Bedeutung sind. Die Auswertung der molekularen Daten sollte daher für weitergehende genetische Untersuchungen der Kandidaten von Nutzen sein. So können nun z.B. die identifizierten Faktoren der Kontrolle des Zellzyklus [PFG 1] [PFG 7] auf eine Kopplung mit Prozessen der Muskelentwicklung untersucht werden. Der kontrollierte Abbau von Proteinen des Zellzyklus oder von muskelspezifischen Signalwegen [PFG 3] [PFG 9] durch Ubiquitinierung [PFG 5] liefert einen weiteren Ansatz für Studien. Ob die aufgeführten Proteine der endogenen Zellerkennung bzw. -adhäsion [PFG 9] beim Aufbau des embryonalen Muskelmusters eine Rolle spielen, kann nun ebenfalls weitergehend analysiert werden.

### 3.5 Beteiligung von Kandidaten-Genen bei der Muskelentwicklung

Unter den Kandidaten-Genen sind Gene deren Beteiligung an der Myogenese schon nachgewiesen wurde. In „loss-of-function“-Mutanten des *gutfeeling*-Gens (*guf*) [PFG 2] (Salzberg et al., 1996) ist z.B. die Myoblastenfusion und die Differenzierung von Muskelfasern gestört. Das *schnurri*-Gen (*shn*) [PFG 7] (Arora et al., 1995) spielt eine Rolle bei der Regulation der *tinman*-Expression im dorsalen Mesoderm (Yin und Frasch, 1998). Tinman (Bodmer et al., 1990) ist für die Differenzierung der dorsalen Körperwandmuskulatur und die Herzentwicklung notwendig (Übersicht: Jagla et al., 2001). Der Muskelphänotyp, welcher durch die Überexpression beider Gene verursacht wurde, ist mit den Erwartungen der zu erhaltenen Gene im Fehlexpressions-„Screen“ in Einklang zu bringen.

Das *Toll*-Gen [PFG 9] (Gerttula et al., 1988; Halfon und Keshishian, 1998):

In der Fehlexpressions-Situation wird vermutlich eine „antisense“-RNA des *Tl*-Gens gebildet (2.3.2). Die embryonale Letalität wird hier also wahrscheinlich durch eine Dosis-Verringerung der *Toll*-Expression verursacht. Neben ihrer Rolle bei Zelladhäsionsprozessen (Keith und Gay, 1990), wird die *Toll*-Signalkaskade bei der antifungalen bzw. Gram-positiven Bakterien Immunabwehr der Fliege benötigt (Lemaitre et al., 1996). Dabei ist die Erkennung von Zellwandbestandteilen durch Rezeptoren von entscheidender Bedeutung (Kim et al., 2000). Sie führt zur Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionskaskade (Übersicht: Silverman und Maniatis, 2001). Die Beteiligung dieses Transduktionswegs beim gerichteten Wachstum der Muskeln wird auch durch die Identifizierung anderer Faktoren, wie z.B. *CG10535* [PFG 3] und *GNBP3* [PFG 9] nahegelegt (3.4).

Das *Syndecan*-Gen [PFG 9] (Spring et al., 1994; Graner et al., 1998; Haerry et al., 1997):

Durch die *P{EP}*-Integration wird eine Fehlexpression des *Sdc*-Gens ermöglicht (Abb. 2-2 b, e, d). Ein Hinweis auf eine potenzielle Funktion des *Syndecan*-Gens, bei der Entwicklung des somatischen Muskelusters ist die endogene Expression in den Apodemen (Abb. 2-3). Die Rolle von *Syndecan* bei Adhäsionsprozessen zwischen mesodermalem und ektodermalem Gewebe kann z.B. mittels Reportergenkonstrukten überprüft werden. Ebenso ist die Erzeugung von „loss-of-function“-Mutationen des *Sdc*-Gens durch eine ungenaue Exzision des *P{EP}*-Elements (Delattre et al., 1995) möglich. Der durch die Fehlexpression von *Sdc* in der *engrailed*-Domäne verursachte Phänotyp (Abb. 2-2 e) ist ein weiterer Ansatzpunkt für eine funktionelle Charakterisierung von *Syndecan*.

Die Beteiligung von Heparansulfat-Proteoglykanen bei Zelladhäsions- oder Signaltransduktionsprozessen (Übersicht: Bernfield et al., 1999) wird durch die Identifizierung von *Syndecan* [PFG 9] und des bei der Synthese von Heparansulfat-Proteoglykanen benötigten Sulfateless-Proteins [PFG 2] impliziert. Das *sulfateless*-(*sfl*)-Gen ist notwendig für die

Modifikation von Proteoglykanen (Lin und Perrimon, 1999) und spielt bei der FGF-Signaltransduktion im Tracheensystem und Mesoderm eine Rolle (Lin et al., 1999). Die Tracheen-Phänotypen in *sulfateless*-mutanten Embryonen ähneln denen von *breathless* „loss-of-function“-Mutationen (Klämbt et al., 1992). Der *Drosophila* FGF-Rezeptor *breathless* (*btl*) ist für die geleitete Astbildung der Tracheen verantwortlich (Lee et al, 1996). Im Mesoderm wird mit *heartless* (Beimann et al., 1996) ein weiterer FGF-Rezeptor exprimiert. Sein Ligand wurde jedoch noch nicht identifiziert (Dossenbach et al, 2001). Eine Funktion des *sfl*-Gens bei der Modifizierung von Signaltransduktions-Komponenten, welche ihrerseits an der Steuerung des gerichteten Auswachsens der Myotuben beteiligt sind, ist vorstellbar.

### 3.6 Vergleich mit anderen Fehlexpressions-„Screens“

Die häufige Verwendung einer bestimmten *P{EP}*-Kollektion (Rørth, 1996; Starz-Gaiano et al., 2001; Duchek und Rørth, 2001; Duchek et al., 2001; Kraut et al., 2001) ermöglicht einen direkten Vergleich von Kandidaten aus verschiedenen Fehlexpressions-„Screens“. Die Anzahl der Kandidaten-Gene, die zur Ausprägung eines erwarteten Phänotyps führen, variiert in diesen vergleichbaren „Screens“ zwischen 0,035% und 3,3% der getriebenen Gene. Mit 1,25% Ausbeute ist der hier vorgestellte „Screen“ in einem mittleren Bereich der Effizienz. Ein entscheidender Unterschied ist jedoch, dass alle hier analysierten *P{EP}*-Linien in der Fehlexpressions-Situation zur embryonalen Letalität führen. Diese Vorauswahl von letalen Phänotypen setzt die Ausbeute an potenziellen Kandidaten-Genen herab, da milde bzw. lebensfähige Phänotypen nicht weiter untersucht wurden. Auch die Induktion von Prozessen die zur Letalität führen beeinflusst also die Anzahl der Kandidaten (Abb. 2-1).

Für einen direkten Vergleich eignet sich ein „Screen“ nach Kontrollgenen des gerichteten Motoraxon-Wachstums (Kraut et al., 2001). Überlappungspunkte bei Entwicklungsprozessen von Motoraxonen und der eng verknüpften somatischen Muskulatur können angenommen werden. In beiden „Screens“ konnten die Kandidaten ähnlichen Proteinfunktionsklassen (PFG) zugeordnet werden. So wurden Enzyme (Kinasen), Faktoren der Protein-Degradierung, Transkriptions-Regulatoren, Helikasen und Plasmaproteine übereinstimmend identifiziert. GTPasen, GTP-bindende Proteine und Signalmoleküle konnten allerdings mit dem Muskelwachstums-„Screen“ nicht identifiziert werden. Kandidaten-Gene, die eine Funktion beim Zellzyklus oder der Zellteilung haben, wurden dagegen von Kraut et al. (2001) nicht gefunden. Das deutet auf einen Sekundäreffekt bei der Erzeugung der Muskelphänotypen hin. Ein solcher Phänotyp könnte durch eine veränderte Distanz der Muskelvorläuferzellen zur epidermalen Muskelanheftungsstelle, durch die Fehlexpression von Zellzyklus-Genen in der Epidermis, verursacht werden. Trotz der tendenziell hohen Übereinstimmung bei den Funktionsklassen, wurden nur drei identische Kandidaten-Gene in beiden „Screens“

identifiziert. Dabei handelt es sich um die Gene für das Ubiquitin-aktivierende Enzym 1 (*Uba1*) (Zur Lage, 1997), den Transkriptionsfaktor Schnurri (*shn*) (Arora et al., 1995) und die DEAD-Box Helikase *eIF-4A* (Dorn et al., 1993). Dieses Ergebnis deutet auf eine hohe Spezifität des durchgeführten Fehlexpressions-„Screens“ hin und auf gemeinsame Mechanismen, die bei der Wegfindung der Axone und der Muskeln eine Rolle spielen. Die mit 3,3% etwas höher liegende Kandidaten-Ausbeute des Motoraxon-„Screens“ ist wohl auf die Durchmusterung auf lebensfähige Phänotypen zurückzuführen.

### **3.7 Fehlexpressionsphänotyp des *aeneas*-Gens**

Der *P{EP}*-abhängige Muskelphänotyp wird durch die Fehlexpression des *aeneas*-Gens verursacht (2.5.1, Abb. 2-7). Die Tatsache, dass das *aeneas*-Transkript weder in Myotuben noch in Apodemen nachgewiesen werden konnte (2.5.2, Abb. 2-8), spricht jedoch gegen eine Mitwirkung des Aeneas-Proteins bei der Steuerung des Muskelwachstums während der Normalentwicklung. Da lediglich die Expression der RNA verfolgt wurde, kann allerdings das Vorliegen eines langlebigen Aeneas-Proteins in den Myotuben aufgrund der frühen mesodermalen Expression nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchung des „loss-of-function“-Phänotyps (3.3; 3.13), der keine Muskelveränderungen beinhaltet, zeigt, dass der „gain-of-function“-Muskelphänotyp nicht die endogene Funktion von Aeneas reflektiert. Auch die Insertion eines zweiten *P*-Elements, *P{lacW}l(3)L1233<sup>R80</sup>*, welches in einer Entfernung von 229 bp zum *P{EP}*-Element liegt, verursacht eine hypomorphe Mutation. Die homozygot mutanten Weibchen exprimierten zwar eine reduzierte Menge an *aeneas*-Transkript (Abb. 2-19), das gerichtete Muskelwachstum ist jedoch auch in diesen Embryonen nicht betroffen. Diese Befunde legen nahe, dass Aeneas beim Aufbau des Muskelmusters normalerweise keine Rolle spielt.

Die Fehlexpression von Genen kann auch dann zu Phänotypen führen, wenn diese keine endogene Funktion in dem getriebenen Gewebe ausüben (Kraut et al., 2001). Ein solches Beispiel ist der Muskelphänotyp (2.5.1, Abb. 2-7), welcher durch die Fehlexpression des *aeneas*-Gens verursacht wurde. Allerdings konnte die Beteiligung des *aeneas*-Genprodukts an Zellmigrationsprozessen in einem zweiten Organsystem nachgewiesen werden (2.9). Die Integration des *P{lacW}*-Elements in das *aeneas*-Gen führt bei homozygoten Embryonen zu einer Störung der Wanderung der Keimzellvorläufer (Abb. 2-20). So konnte mithilfe des Fehlexpressions-„Screens“ ein Gen identifiziert werden, welches bei der Keimzellwanderung involviert ist.



### 3.8 Charakterisierung des *aeneas*-Gens

#### 3.8.1 Embryonale Expression des *aeneas*-Gens

Der erste Hinweis, der zur Untersuchung der gerichteten Wanderung der Polzellen führte, war das endogene Expressionsmuster des *aeneas*-Gens (2.5.2, Abb. 2-8). Dabei konnte eine deutliche Anreicherung des *aeneas*-Transkripts in Zellen und Geweben, welche für die korrekte Migration der Polzellen entscheidend sind, beobachtet werden (1.3.1).

#### 3.8.2 Subzelluläre Lokalisation des Aeneas-Proteins

Um die Lokalisation des Aeneas-Proteins zu ermitteln, wurde die *aeneas*-cDNA in ein UAST<sub>eGFP</sub>-Reportergenkonstrukt kloniert (2.5.4, Abb. 2-11; 4.1.2, Tab. 4-C), wodurch eine Gal4-gesteuerte Expression eines Aeneas-eGFP-Fusionsproteins im transgenen Tier ermöglicht wurde. Die Lokalisation des Aeneas-eGFP-Fusionsproteins in dreidimensional erscheinenden zytoplasmatischen Substrukturen deutet auf eine Anreicherung des Aeneas-Proteins im Golgi-Apparat hin. Eine Aussage über die exakte zytoplasmatische Lage kann aber erst nach einer Doppelfärbung mit Markern für bestimmte Zellkompartimente, wie dem Golgi-Apparat, gemacht werden. Solange kein Aeneas-spezifischer Antikörper gewonnen wird, kann allerdings auch eine Fehllokalisation des Fusionsproteins, durch den GFP-Anteil verursacht, nicht ausgeschlossen werden (Hanh T. Nguyen, persönliche Mitteilung).

#### 3.8.3 Aeneas-Protein-Domänen

Die Suche nach konservierten Protein-Domänen ist ein erster Schritt für eine funktionelle Charakterisierung eines Genprodukts. Im Falle des *aeneas*-Gens wurde die annotierte Protein-Sequenz CT34420 (GadFly) als Basis einer weiteren *in silico*-Analyse genutzt. Das putative *aeneas*-Transkript kodiert demnach für drei diagnostische Proteindomänen (5-FTHF-Cyclo-Ligase, RNP-1 und NLS-BP, 2.6.1). Die Ergebnisse der subzellulären Lokalisation eines Fusionskonstrukts sprechen gegen eine Funktion der Kern-Lokalisationssignale, da eine Ansammlung des Fusionsproteins im Cytoplasma gefunden wurde (3.8.2). Das putative RNA-Bindungsmotiv und die Kern-Lokalisations-Signale treten zudem häufig als „falsch positive Treffer“ auf (GadFly, InterPro motifs). Als Indiz für eine mögliche Aeneas-Funktion bleibt also die erwähnte Enzym-Domäne.

Damit reiht sich Aeneas nahtlos in eine Klasse bereits identifizierter Gene ein, welche die Polzellmigration beeinflussen und die für Enzyme kodieren (Van Doren et al., 1998; Starz-Gaiano et al., 2001). Das Aeneas-Protein besitzt eine Domäne, die Homologie zur Konsensussequenz der Enzym-Klasse 5-Formyltetrahydrofolat Cyclo-Ligasen zeigt (GadFly;

**2.6.1;** Abb. **2-14**). Die 5-FTHF-Cyclo-Ligase ist für die zelluläre Bereitstellung von Folsäurederivaten notwendig (Übersicht: Appling, 1991). Folsäure stimuliert z.B. die Reorganisation des Zytoskeletts bei *Dictyostelium*. Sie wirkt in diesem Organismus als „chemo attractant“ und führt zur Ausbildung von Filopodien (Rifkin, 2001). Neben einer metabolischen Funktion, könnte die spezifische Expression des Enzyms zu einer Zell-abhängigen DNA-Replikation führen (Huennekens et al., 1987).

Ein Sequenzabgleich der Aeneas-Domäne mit verschiedenen 5-FTHF-Cyclo-Ligasen führt jedoch nur zu einer niedrigen Identitätsrate (**2.2.1;** Abb. **2-15 a**), welche diese Enzymfunktion fraglich erscheinen lässt. Im *Drosophila*-Genom konnte ein weiteres Gen (*CG11079*) identifiziert werden, das eine deutlich höhere Aminosäure-Identität zu den 5-FTHF-Cyclo-Ligasen aufweist (Abb. **2-15 c**). Es ist daher wahrscheinlich, dass dieses Gen das eigentliche *Drosophila*-Homolog des Enzyms ist und Aeneas ein Mitglied einer neuen, funktionell uncharakterisierten Proteinklasse, deren Aminosäuresequenz allerdings in so unterschiedlichen Lebewesen wie *A. thaliana* und *H. sapiens* konserviert ist (Abb. **2-15 b**). In der Aeneas-Domäne weist Aeneas eine 48%ige Identität und eine 75%ige Ähnlichkeit der Aminosäuren zum humanen Protein (*FLJ12998*) auf.

Die enzymatische Aktivität der Aeneas-Domäne wurde nicht charakterisiert, da Zweifel an ihrer Funktion als 5-FTHF-Cyclo-Ligase bestehen (**2.6.1**). Die Beteiligung eines Folsäurederivats bei der gerichteten Migration der Polzellen wurde aufgrund dieser Bedenken ebenfalls nicht weiter untersucht.

### 3.9 Das *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Allel

Die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse (**2.5.3**) und der RT-PCR-Untersuchung (**2.8**) deuten auf zwei *aeneas*-Transkripte mit unterschiedlicher Länge hin. Das längere Transkript wird in allen Entwicklungsstadien der Fliege exprimiert (Abb. **2-10**). Das kürzere Transkript findet sich dagegen nur in frühen Embryonalstadien, es stellt vermutlich eine maternale Komponente dar. Wahrscheinlich ist das „Splicing“ des längeren Transkripts durch die Insertion des *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Elements beeinträchtigt (Abb: **2-18**). Das *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Allel stellt aufgrund der verringerten Expression des längeren Transkripts ein hypomorphes Allel dar. Darauf deuten auch „whole mount“-*in situ*-Hybridisierungen an Präparaten homozygoter *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Embryonen (Abb. **2-19**) hin.

### 3.10 Funktion des *aeneas*-Gens

Die Funktion von *aeneas* bei der gerichteten Migration der Polzellen (**2.5.2**) wurde mithilfe eines Keimzell-spezifischen Markers untersucht. Bei der homozygoten *P{lacW}*-Insertionslinie *l(3)LI233<sup>R80</sup>* (**2.5.3;** Abb. **2-19**) wurde eine gestörte Polzellwanderung beobachtet, die

schon vor der Gastrulation erkennbar wird. In allen bislang bekannten Mutanten tritt hingegen eine Störung der Polzellmigration frühestens nach Beginn der Gastrulation, bei der Wanderung der Polzellen durch die posteriore Mitteldarmtasche, auf (Deshpande et al., 2001). Damit wäre *Aeneas* von den an der Polzellwanderung beteiligten Genen dasjenige, dessen Aktivität noch vor allen bisher bekannten Gen-Produkten benötigt wird.

Bei den *aeneas*-mutanten Embryonen durchbrechen einzelne Polzellen die wildtypische Trennung von Keimbahn und Soma und wandern bereits schon kurz nach der Zellularisierung der somatischen Zellen in das Innere des Embryos ein (2.9; Abb. 2-20 b). Diese frühe Migration der Polzellen durch die unterliegende somatische Zellschicht ist ein bislang noch nicht beschriebener Phänotyp. Im Gegensatz dazu halten die Keimzellen in der Wildtyp-Situation in diesem Stadium engen Kontakt zueinander (Jaglarz und Howard, 1995). Sie bleiben nach der Zellularisierung und während einem Großteil der Gastrulation vom Soma getrennt (Übersicht: Skaer, 1993; 1.3). In Migrationsmutanten, wie *wunen* (Zhang et al., 1996), *wunen 2* (Starz-Gaiano et al., 2001) oder *columbus* (Van Doren et al., 1998), ist die Wanderung der Polzellen nach der Durchquerung der Mitteldarmtasche beeinträchtigt. Im Vergleich zu diesen Mutanten verlassen einige Polzellen in *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Embryonen also schon deutlich früher den Mitteldarm (Abb. 2-20 d). Nach dem transversalen Passieren des Darm-Primordiums verliert zusätzlich ein Teil der Polzellen in diesen Embryonen den Kontakt zur Darmoberfläche. Diese wandern danach auch nicht dorsal in Richtung Mesoderm, sondern in eine ventrale Position (Abb. 2-20 f). Die Wanderung der verbliebenen Polzellen, welche das Mitteldarm-Primordium normal verlassen haben, zu den mesodermalen Anteilen der Gonaden ist in den homozygoten *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Embryonen dann jedoch nur in seltenen Fällen gestört.

Die ektopische Fehlexpression von *hedgehog* (Deshpande et al., 2001), *wunen* und *wunen 2* (Starz-Gaiano et al., 2001) bzw. *columbus* (Van Doren et al., 1998), mithilfe von gewebe-spezifischen Gal4-Treibern, führte zu einer Abstoßung bzw. Anziehung der wandernden Polzellen von der ektopischen Proteinquelle. Diese Proteine dienen also direkt oder indirekt als richtungsgebende Signalmoleküle bei der Zielfindung der Keimzellen. Ob das *aeneas*-Gen eine ähnliche Funktion ausübt, muss in weiterführenden Experimenten analog zu den oben genannten Experimenten abgeklärt werden.

### **3.11 Phänotypische Variabilität des *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Allels**

Der Migrationsphänotyp der maternal und zygotisch homozygoten *l(3)LI233<sup>R80</sup>*-Embryonen ist nicht vollständig penetrant. Der beschriebene Phänotyp konnte nur in ca. 25% der Embryonen beobachtet werden. Eine Erklärung für die schwache Penetranz ist, dass

$l(3)L1233^{R80}$  ein hypomorphes Allel darstellt, bei dem die Genproduktmenge oder -aktivität reduziert ist.

Northern Blot-Experimente deuten darauf hin, dass im Wildtyp zwei unterschiedlich lange Transkripte abgelesen werden (2.5.3; Abb 2-10). Neben dem zygotischen Transkript konnte eine kürzere maternale Variante nachgewiesen werden. RT-PCR-Analysen lassen vermuten, dass das „Splicing“ des längeren Transkripts durch die Integration des  $l(3)L1233^{R80}$ -Elements beeinträchtigt ist (2.8; Abb. 2-18). Dennoch konnte RNA im Bereich des zur *P*-Integration „downstream“ liegenden Exons nachgewiesen werden (Abb. 2-18). Das lässt ebenfalls auf einen zweiten Transkriptionsstartpunkt „downstream“ der *P*-Integration schließen. Die kurze Transkript-Variante wird in dem  $l(3)L1233^{R80}$ -Allel nicht beeinflusst, daher sind vermutlich noch Teilfunktionen des Aeneas-Proteins erhalten. Dies würde ebenfalls die schwache Penetranz des Phänotyps erklären. Um einen „loss-of-function“-Phänotyp zu erhalten schlossen sich Experimente an, welche die Generierung einer Nullmutation des *aeneas*-Gens zur Aufgabe hatten.

### 3.12 Remobilisierung des *P{lacW}* $l(3)L1233^{R80}$ -Elements

Durch Remobilisierung des *P{lacW}*-Elements, verbunden mit einer ungenauen Exzision, wurden Deletionen im *aeneas*-Gen erzeugt (Delattre et al., 1995). Die Tatsache, dass auch homozygot lebensfähige Deletions-Stämme etabliert werden konnten (Abb. 2–21) spricht dagegen, dass das *aeneas*-Gen essenziell für die Lebensfähigkeit der Fliege ist. Der *aeneas*-Lokus wurde in diesen „jump out“-Stämmen mithilfe einer PCR-Analyse untersucht (Abb. 2–22). Sowohl die Exzision des *P{lacW}*-Elements, als auch eine Deletion führt zu einer Längenänderung der PCR-Amplifikationsprodukte.

In der homozygot semilethalen  $\Delta l(3)L1233^{R80-C2}$ -Linie war es zu einer Deletion eines 1,4 kb großen Fragments im *aeneas*-Gen gekommen (Abb. 2-23). Hierdurch wird ein „Stop-Codon“ im Gen generiert, und ein auf 67 Aminosäuren verkürztes Teil-Protein kann translatiert werden (Abb. 2-23). Die Deletion führt zum Verlust der putativen Enzym-Domäne und zu einem vermutlich unfunktionellen Aeneas-Protein. Daher sollte das neu erzeugte  $\Delta l(3)L1233^{R80-C2}$ -Allel eine Nullmutation des *aeneas*-Gens darstellen. Dennoch führt diese Aeneas-Nullmutation nicht zur Letalität der Fliegen. Es ist möglich, dass die Funktion von Aeneas aufgrund einer Redundanz weitgehend von anderen Genen komplementiert wird. Das komplette Fehlen der Aeneas-Genaktivität muss deshalb nicht zum Auftreten eines letalen Phänotyps führen. Eine zu Aeneas redundante Wirkung könnte das annotierte *Drosophila*-Gen *CG11079* (2.6.1) ausüben. Die Redundanz des *aeneas*-Gens macht es für die Analyse mit Defektallelen nur schwer zugänglich. In diesem Fall sollte eine "gain-of-function"-Mutation instruktiver sein (3.15).

Anhand von Kreuzungen mit Defizienz-Stämmen des *aeneas*-Lokus konnte gezeigt werden, dass die erzeugte Deletion nicht mit der beobachteten Semiletalität der homozygoten  $\Delta l(3)L1233^{R80-C2}$ -Linie korreliert ist (2.11). Eine mögliche Erklärung für diese Semiletalität ist eine partielle Reintegration des *P*-Elements, wobei jedoch der selektionierbare *white*-Marker verloren ging. Ein solches *P*-Element-Teilstück, welches nun möglicherweise ein anderes Gen betrifft, kann nicht mehr anhand der roten Augenfarbe verfolgt werden. Die Mutation eines anderen Gens durch diese Reintegration oder die Erzeugung einer sogenannten „second hit“-Mutation, durch die Translokation des *P*-Elements, ist also möglich. Unter den etablierten homozygot lebensfähigen Stämmen befanden sich einige, in denen das *P*-Element exakt exzidiert war. Diese Revertanten dienen als Beleg für die spezifische Ausbildung des Migrationsphänotyps durch eine Mutation im *aeneas*-Gen in  $l(3)L1233^{R80}$ -Embryonen.

### 3.13 Phänotyp der transheterozygoten $\Delta l(3)L1233^{R80-C2} / Df(3R)Z1$ -Linie

Der Einfluss der erzeugten Deletion im *aeneas*-Gen auf die Polzellwanderung wurde mithilfe einer  $\alpha$ Vasa-Antikörperfärbung untersucht. Die Auswirkungen der in 3.12 erwähnten „second hit“-Mutation wurde dadurch eliminiert, dass die Deletionslinie mit einer Defizienzlinie aus diesem genomischen Bereich gekreuzt wurde (2.11). Ein 50%iger Anteil der Embryonen zeigt einen Polzellmigrationsphänotyp. Die Nullmutation des *aeneas*-Gens führt also zu einer Erhöhung der Penetranz des Phänotyps. Obwohl alle Embryonen maternal und zygotisch transheterozygot das Nullallel tragen, ist nicht bei allen ein mutanter Phänotyp ausgeprägt. Das könnte bedeuten, dass das *aeneas*-Gen zwar wichtig für die gerichtete Migration der Polzellen ist, diese aber zusätzlich durch redundante Faktoren weitgehend abgesichert ist.

Auch in „einfachen“ Zellmigrationssystemen wie der „border cells“-Migration konnte eine substanzielle Redundanz von Signalmolekülen festgestellt werden (Duchek et al., 2001). Die Zielführung der „border cells“ zur Oozyte wird von zwei redundant wirkenden Faktoren, der Rezeptor-Tyrosin-Kinase PVR und dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF, gesteuert (Duchek und Rørth, 2001). Bei der Polzellmigration agieren ebenfalls verschiedene Gene in Redundanz (1.3.1). Wunen und Wunen2 wirken redundant bei der Führung der Keimzellen (Starz-Gaiano et al., 2001). In *columbus*-Mutanten sind durchschnittlich nur 25% der Polzellen mit dem Endoderm verbunden und wandern nicht zum Mesoderm (Van Doren et al., 1998). Auch für den *hedgehog*-Signaltransduktionsweg wird eine partielle Redundanz diskutiert (Deshpande et al., 2001).

Ein subtiler Effekt von individuellen Faktoren und genetische Redundanz sind bei Migrationsprozessen also vermutlich eher die Regel, als eine Ausnahme. Die Keimzell-

wanderung ist durch redundant wirkende Faktoren abgesichert, daher führt der Ausfall von einem dieser Gene nicht zur Sterilität der Fliegen. Ein Kandidat, der eine zu *Aeneas* redundante Wirkung auf die frühe Wanderung der Polzellen haben könnte, ist die annotierte 5-FTHF-Cyclo-Ligase (*CG11079*) (Abb. 2-15 a). Diese sollte in nachfolgenden Experimenten auf eine Funktion bei der Polzellwanderung untersucht werden. Eine genetische Interaktion mit dem *aeneas*-Gen kann in Epistaseexperimenten geklärt werden, ähnlich wie bei der Etablierung des Segmentmusters von *Drosophila* (St Johnston und Nüsslein-Volhard, 1992; Übersicht: Pankratz und Jäckle, 1993; Übersicht: Sanson, 2001).

Zusätzlich zu der erhöhten Penetranz konnte in der Deletionslinie eine leichte Verstärkung des Phänotyps festgestellt werden. Die Polzellen migrieren bereits im Embryonalstadium 5 durch das somatische Epithel (Abb. 2-24 b, e). Während dieser Durchwanderung nehmen die Polzellen eine Tropfenform an und bilden filopodienartige Auswüchse (Abb. 2-24 e). Dies weist auf eine aktive Wanderungsbewegung der Polzellen hin. Eine ähnliche Formveränderung findet im Wildtyp bei der transendodermalen Migration statt (Jaglarz und Howard, 1995). Die Anzahl der Polzellen, die in der amnioproktodealen Invagination einwandern, ist in der *aeneas*-Nullmutante zum Teil reduziert (Abb. 2-24 d). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Phänotyp der potenziellen Nullmutante im Vergleich zu den homozygoten *l(3)L1233<sup>R80</sup>*-Embryonen verstärkt ist, sowohl die Penetranz betreffend, als auch die Qualität des Phänotyps.

### **3.14 Erklärungsmöglichkeiten des *aeneas*-Phänotyps**

Sowohl bei der verfrühten Durchwanderung der somatischen Zellschicht in *aeneas*-mutanten Embryonen (Abb. 2-20 b), als auch bei der transendodermalen Migration (Abb. 1-4 c) im Wildtyp sind zwei Zelltypen beteiligt: die Polzellen und das Mitteldarmepithel. Die Wanderung durch das Darmgewebe erfordert eine Veränderung der zellulären Struktur bei beiden Zellarten (Jaglarz und Howard, 1995). Zunächst findet eine Formänderung der Polzellen statt. Es bilden sich filopodienartige Auswüchse, die Keimzellen nehmen eine tropfenförmige Gestalt an, und der Kontakt zwischen den Polzellen lockert sich. Auch das endodermale Epithel durchläuft eine Umstrukturierung. Der Gewebeverband wird gelockert, indem vermutlich „adherens junctions“ umgeordnet werden (Tepass und Hartenstein, 1994). Diese Interaktion der zwei Gewebearten erlaubt die Invasion der Polzellen in die somatische Zellschicht.

Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Migrationsphänotyp ist eine Beteiligung des *aeneas*-Genprodukts bei der Zelladhäsion zwischen Keimzellen und den benachbarten somatischen Zellen. Die frühe *aeneas*-Expression in den Polzellen scheint mit der Adhäsion

dieser Zellen an das somatische Gewebe korreliert zu sein. So findet in der Wildtyp-Situation der transendodermale Durchtritt erst nach dem Abbau des *aeneas*-Transkripts in den Polzellen statt. Analog dazu wandern in Mutanten, in denen kein *aeneas*-Transkript in den Polzellen nachweisbar ist, einzelne Keimzellen deutlich zu früh in das anliegende somatische Gewebe ein. Aeneas könnte aber auch, aufgrund seiner mutmaßlichen enzymatischen Funktion, bei der Biosynthese bzw. Modifikation von Adhäsionsmolekülen involviert sein. Die Auswirkung der *aeneas*-Mutation auf die Adhäsion im Polzellverband oder die zwischen somatischen Zellen und den Polzellen, kann anhand von Doppelfärbungen mit Keimzellmarkern ( $\alpha$ Vasa-Antikörper) und F-Aktin-Markern (Rh-Phalloidin) untersucht werden. Eine spezifische Änderung in der F-Aktin-Verteilung in beiden Zelltypen ist bei der transendodermalen Polzellwanderung zu beobachten (Jaglarz und Howard, 1995). In *aeneas*-Mutanten sollte dementsprechend bei der frühen Einwanderung der Polzellen in das somatische Gewebe eine veränderte F-Aktin-Verteilung beider Zelltypen beobachtet werden. Die Verwendung von basolateralen Epithelmarkern wie Neurotactin und  $\alpha$ Spectrin, welche exakt während der transendodermalen Polzellwanderung eine reduzierte Expression aufweisen (Marty und Lehmann, 2002), sollte ebenfalls bei der Untersuchung der *aeneas*-Mutante dienlich sein.

Eine Reorganisation des Zytoskeletts, die zur Ausbildung von Filopodien führt, kann durch Produkte von Biosynthese-Reaktionswegen ausgelöst werden (Rifkin, 2001). Eine Steuerung dieser Zell-Zell-Erkennung durch das Aeneas-Protein könnte die gerichtete Migration der Polzellen beeinflussen. Die frühe Migration der Polzellen beinhaltet eine „aktive Suche“ nach zytoplasmatischen Auswüchsen der somatischen Zellen (Jaglarz und Howard, 1995). Eine derartige Filopodien-Bildung kann durch Folat-Metabolite gesteuert werden (Rifkin, 2001). Eine Beteiligung von Faktoren des Folat-Metabolismus bei der Keimzellwanderung ist jedoch unwahrscheinlich, da das Aeneas-Protein vermutlich nicht der 5-FTHF-Cyclo-Ligasen-Klasse angehört (3.8.3). Aufgrund des Fehlexpressionsphänotyps, bei dem u.a. eine gestörte Wegfindung und Adhäsion einiger Myotuben beobachtet werden konnte (Abb. 2-7 b), erscheint eine Beeinträchtigung der Zell-Zell-Erkennung zwischen verschiedenen Geweben in *aeneas*-Mutanten jedoch plausibler. Die genannten Hypothesen bleiben dennoch spekulativ, da ein spezifischer *aeneas*-Antikörper fehlt, der Auskunft über die Proteinlokalisierung im Embryo geben könnte. Die *aeneas*-RNA wird maternal in den Embryo eingelagert und liegt zunächst ubiquitär vor. Der Zeitpunkt der Translation des Aeneas-Proteins und seine Lokalisation sollten neue Hinweise auf die Funktion des Proteins geben.

So werden einige Prozesse der Polzelldetermination durch maternal eingelagerte Effektorgene gesteuert (Übersicht: Mahowald, 2001). Diese maternalen Effektorgene sind auch für die Keimzellwanderung wichtig. Ein solcher zellautonom wirkender Faktor ist das Nanos-Protein (Nos) (Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1986; Asaoka-Taguchi et al., 1999). In der Nachkommenschaft von Weibchen, denen *nanos*-Genaktivität fehlt, wandern die Keimzell-



vorläufer nicht zielgerichtet und verschmelzen nicht mit den somatischen Gonadenvorläufern (Deshpande et al., 1999). Der Grund für diese Migrationsdefekte ist eine Störung der Hemmung der zygotischen Transkription in den Polzellen (Kobayashi et al., 1996; Forbes und Lehmann, 1998). Eine spezifische Lokalisation des Aeneas-Proteins in den Polzellen würde auf eine ähnliche Funktion als Effektorgen deuten.

### 3.15 Weiterführende Experimente zur Charakterisierung von Aeneas

Die Generierung eines UAST-Konstrukts der „full length“ *aeneas*-cDNA ist ein wichtiger Schritt zur weiteren Analyse der Aeneas-Funktion. Zunächst könnte der bei der Fehlexpression aufgetretene Muskelphänotyp auf eine spezifische Induktion, durch die Überexpression des *aeneas*-Gens, hin überprüft werden. Zusätzlich zu dem *sr239ΔPanGal4*-Treiber (2.1) sollte diese UAST-Linie auch mit anderen Treiberlinien gekreuzt werden. Die Fehlexpression in Geweben, welche bei der Polzellwanderung involviert sind, könnte Aufschluß über die Wirkungsweise des Aeneas-Proteins geben. So sollte die Überexpression im Mesoderm mithilfe des *twist-24B*-Gal4-Treibers (Starz-Gaiano et al., 2001) Informationen über eine Funktion von *aeneas* für das gerichtete Einwandern der Keimzellen in das Mesoderm geben und eine potenzielle anziehende bzw. abstoßende Funktion von Aeneas festgestellt werden können. Zusätzlich könnte der *nos*-Gal4-VP16-Treiber (Van Doren et al., 1998) für eine maternale Fehlexpression von *aeneas* genutzt werden, um die Auswirkungen auf die frühe Polzellwanderung beobachtet werden. Die Überexpression des *aeneas*-Gens mit einer, zum endogenen Expressionsmuster ähnlichen Treiberdomäne sollte in *aeneas*-„loss-of-function“-Embryonen zu einer Rettung des mutanten Migrationsphänotyps führen.

Eine artifizielle Lokalisation von Aeneas in Polzellen könnte durch die Herstellung eines Fusionskonstrukts der *nanos*-3'-UTR mit dem *aeneas*-ORF ermöglicht werden. Eine solche Fehllokalisation des Aeneas-Fusionsproteins sollte mit einer endogenen Aeneas-Funktion in den Polzellen interferieren und die frühe Migration beeinflussen. Ähnlich könnte die *aeneas*-3'-UTR in einem GFP-Fusionskonstrukt auf ihre Beteiligung bei der Translationskontrolle des Aeneas-Proteins hin untersucht werden. Eine genetische Interaktion von Aeneas mit anderen Proteinen, die eine Rolle bei der Keimzellmigration spielen, könnte z.B. in Kreuzungen mit *vasa*-, *wunen*-, *columbus*-Mutanten oder der kürzlich identifizierten *slow as molasses* (*slam*)-Mutante (Stein et al., 2002) untersucht werden. Eine Analyse der Entwicklung der Keimzellen im adulten Tier und die Untersuchung der Oogenese sind zusätzliche Punkte für weitergehende Experimente.

## 4 Material & Methoden

### 4.1 Molekularbiologie

Nachstehend wird überwiegend auf modifizierte Methoden eingegangen, die in dieser Form nicht in den gängigen Methodensammlungen zu finden sind. Wenn nicht anders beschrieben, wurden Standard-Methoden nach Protokollen von Sambrook et al. (2000) durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzungen von Puffern, Medien und Lösungen.

#### 4.1.1 Vektoren

Bei der molekularen Charakterisierung des *aeneas*-Gens wurden die in Tab. 4-A aufgelisteten Vektoren verwendet.

Vektor	Referenz	Wirt	Verwendung
pOT2A	M. Palazzolo	<i>E. coli</i> XL1 Blue	cDNA-Klone (ESTs vom BDGP)
pTOPO II	Invitrogen	<i>E. coli</i> XL1 Blue	Subklonierung von PCR-Produkten

Tab. 4-A: Klonierungsvektoren

Genomische DNA-Fragmente aus „plasmid rescue“-Experimenten waren in den *P*-Element-Vektor pUAST (Tab. 4-B) integriert. Für die Transformation von *P*-Element-Konstrukten in die Keimbahn von *Drosophila* wurden je nach Anwendung die in Tab. 4-B aufgeführten Transformationsvektoren verwendet:

Vektor	Referenz	Verwendung
UAST <sub>eGFP</sub> -pCaSpeR3	B. Linder-Stuart (MPI bpc)	subzelluläre eGFP-Lokalisation
UAST-pCaSpeR3	Brand & Perrimon, 1993	ektopische Expression, Gal4/UAS

Tab. 4-B: Vektoren zur *Drosophila*-Keimbahn-Transformation

#### 4.1.2 DNA-Konstrukte

5 Konstruktbezeich	6 Klonierung
UAST <sub>eGFP-aeneas</sub>	UAST-Konstrukt mit einem Großteil des ORF von <i>aeneas</i> . Das 1.637 bp lange (BglII/SalI) cDNA-Fragment aus pOT2A ( <i>LD30155</i> -cDNA) wurde in den UAST <sub>eGFP</sub> Vektor (BglIII/XhoI) kloniert.
UAST <sub>CG4963</sub>	UAST-Konstrukt mit ORF von <i>CG4963</i> . Das 2.965 bp lange (EcoRI) cDNA-Fragment ( <i>GH09840</i> -cDNA) wurde in den UAST Vektor kloniert.

Tab. 4-C: DNA-Konstrukte

#### **4.1.3 Molekulare Charakterisierung des *aeneas*-Lokus**

Die molekulare Charakterisierung des *aeneas*-Gens begann mit der Analyse genomischer DNA aus „plasmid rescue“-Experimenten (4.1.10) von der *P{EP}*-Element-Insertionslinie *P{EP}/36553*. Das dabei isolierte genomische DNA-Fragment aus der *aeneas*-Region wurde nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977) sequenziert (Applied Biosystems 373N Sequenzierautomat) und diente als Ausgangspunkt einer *in silico*-Suche im *Drosophila*-Genom (Adams et al., 2000). Die zugehörige cDNA-Sequenz (*LD30155*) ist unter der Zugangsnummer AA950202 in der BDGP-(Berkeley Drosophila Genome Project)-Datenbank veröffentlicht.

#### **4.1.4 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab**

Kleine Mengen DNA wurden nach der LiCl-„Boiling“ Methode (Wilimzig, 1985) isoliert. 1,5 ml einer *E. coli* üN-Kultur wurden zentrifugiert (4000 rpm, 1 min). Das Sediment wurde in 200 µl TELT (50 mM Tris pH 8,0; 62,5 mM EDTA; 2,5 M LiCl<sub>2</sub>; 0,4% Triton X-100) mit Lysozym (0,7 µg/µl) resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und 2 min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Anschließend wurde 5 min auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (15000 rpm, 8 min). Das entstandene Präzipitat wurde verworfen und der Überstand mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Die Plasmid-DNA wurde präzipitiert (15000 rpm, 15 min), mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl TE aufgenommen. Ein Zehntel des Volumens wurde für Restriktionsverdauung bzw. Sequenzierungen eingesetzt.

#### **4.1.5 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab**

Plasmid-DNA für Keimbahntransformationen oder Sequenzierungen wurde mithilfe des QIAGEN Plasmid Kits nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Als Ausgangsmaterial wurden 500 ml einer *E. coli* üN-Kultur eingesetzt. Die isolierte DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen. Bei Plasmid-DNA für Keimbahntransformationen folgten noch zwei Phenol-, Phenol/Chloroform-Extraktionen. Danach wurde mit 2,5 Volumen Ethanol 2 h bei -20°C gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen und das Präzipitat in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **4.1.6 Präparation von genomischer DNA**

Die Präparation von genomischer DNA erfolgte jeweils aus 50 – 100 µl Embryonen, 100 µl Larven bzw. 25 – 30 adulten Fliegen. Die Fliegen wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt und in 180 µl PBS

mit einem Plastikpistill zerstoßen. Für RNase-freie DNA wurde das Homogenisat mit 4 µl RNase A (100 mg/ml; Sigma) versetzt und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde es mit 200 µl Lyse-Puffer und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und 10 min bei 70°C inkubiert. Die Mischung wurde danach mit 200 µl 100% Ethanol versetzt. Der gesamte Ansatz wurde auf QIAGEN DNeasy-Säulen gegeben und bei RT in einer Heraeus-Tischzentrifuge bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA zweimal mit Ethanol-haltigen Waschpuffern gewaschen und danach mit Elutionspuffer aus der Säulen-Matrix eluiert. Hoch reine genomische DNA wurde zudem noch mithilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion weiter aufgereinigt.

#### **4.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN) exakt nach Angaben des Herstellers aus Agarosegelen isoliert.

#### **4.1.8 Autoradiographie**

Die mit radioaktiv markierten Sonden hybridisierten und in Plastikfolie eingeschweißten Nylonmembranfilter wurden in eine Autoradiographiekassette mit beidseitiger Verstärkerfolie (X-OMATIC, Kodak) gelegt. Anschließend wurde der Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak) aufgelegt und bei -80°C exponiert. Die Filmentwicklung erfolgte in einer Entwicklermaschine (X-Ray Automatic Processor QX-60, Konica).

#### **4.1.9 Sequenzanalyse von DNA**

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde mithilfe eines ABI-Sequenzierautomaten und dem PRISM ready reaction-Kit (Applied-Biosystems) von Gordon Dowe bzw. Nicole Beinert (MPI für biophysikalische Chemie) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mithilfe der Software Sequencher (Gene Codes Corporation) und dem Blast-Algorithmus von NCBI und BDGP analysiert.

#### **4.1.10 „plasmid rescue“ von genomischer DNA**

Für die Isolierung der Plasmid-DNA des *P*-Elements *P{lacW}* (Spradling et al., 1999) bzw. des *EP*-Elements *P{EP}* (Rørth, 1996) und der an den Elementen angrenzenden genomischen DNA wurden jeweils 10 µg genomische DNA der Insertionslinien *P{lacW}l(3)L1233* bzw. *P{EP}36553* mit der Restriktionsendonuklease EcoRI in 50 µl Reaktionsvolumen über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym Hitze-inaktiviert (70°C, 10 min), der

gesamte Ansatz mit Ethanol präzipitiert und in 50 µl TE resuspendiert. Für die anschließende Ligation (über Nacht bei 4°C) wurde das Reaktionsvolumen unter Zugabe von Ligationspuffer, 2 U T4 DNA-Ligase (Roche) und H<sub>2</sub>O auf 200 µl erhöht. Nach der Fällung des Ligationsansatzes wurde das Präzipitat in 25 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Transformation des gesamten Ansatzes erfolgte mittels Elektroporation (Gene Pulser, Biorad) nach den Angaben des Herstellers in *E. coli* XL1 Blue. Anschließend wurden die Bakterien 1 h bei 37°C in 1 ml LB-Medium geschüttelt. Danach wurde die Bakteriensuspension auf Ampizillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden von Einzelkolonien Kulturen angeimpft und aus diesen Plasmid-DNA isoliert, welche dann durch Restriktionsverdau und Sequenzierung weiter analysiert wurde.

#### 4.1.11 Inverse PCR auf genomischer DNA

Als zweite Möglichkeit, die *P*-Element-Vektoren und die sie flankierende genomische DNA zu isolieren, wurde die Methode der inversen PCR angewendet (Silver, 1991). 10 µg genomische DNA des zu analysierenden *P{lacW}*- bzw. *P{EP}*-Stamms wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Sau3A*, *HinPI* oder *MspI* in einem Volumen von 50 µl über Nacht bei 37°C verdaut. Der Restriktionsverdau wurde durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C abgestoppt. Danach wurde der gesamte Ansatz mit Ethanol präzipitiert und in 50 µl TE resuspendiert. Die anschließende Ligation wurde über Nacht bei 4°C mit 2 U T4 DNA-Ligase (Roche) in einem Volumen von 200 µl durchgeführt. Nach dem Fällen des Ligationsansatzes wurde das Präzipitat in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Für die Isolierung der flankierenden genomischen DNA am 3'- bzw. 5'-Ende des *P*-Elements wurde dann eine PCR auf 10 µl der resuspendierten, ligierten DNA, in einem Gesamtvolumen von 50 µl, durchgeführt. Die verwendeten PCR-Primer waren komplementär zu *P{lacW}*- bzw. *P{EP}*-Sequenzen. Die 5'-PCR wurde bei einer „Annealing“-Temperatur von 60°C durchgeführt. Die „Annealing“-Temperatur für das 3'-Ende lag dagegen bei 55°C. Die PCR wurde mit den Komponenten des Hot Star Taq Systems (QIAGEN) im Gene Amp® 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt.

Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1 x	95°C	15 min	Taq-Aktivierung
1 x	75°C	2 min	-
25 x	95°C	30 sec	Denaturierung
	55°C / 60°C	1 min	„Annealing“
	65°C / 68°C	2 min	Elongation
1 x	72°C	10 min	finale Elongation
1 x	4°C	∞	„Soak“

**Tab. 4-D:** PCR-Programm (inverse PCR)

Sequenzen der verwendeten Primer für die inverse PCR:*P{lacW}*-5'-Ende:

Pry4: 5' CAA TCA TAT CGC TGT CTC ACT CA 3'  
Plw3-1: 5' TGT CGG CGT CAT CAA CTC C 3'

*P{lacW}*-3'-Ende:

Plac4: 5' ACT CTG GGT TAG GTC CTG TTC ATT GTT 3'  
Plac1: 5' CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT 3'

*P{EP}*-5'-Ende:

Pwht1: 5' GTA ACG CTA ATC ACT CCG AAC AGG TCA CA 3'  
Plac1: 5' CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT 3'

*P{EP}*-3'-Ende:

Pry4: 5' CAA TCA TAT CGC TGT CTC ACT CA 3'  
Pry1: 5' CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT 3'

**4.1.12 PCR auf genomischer DNA**

Für die Analyse der *l(3)L1233*-Linie (Abb. 2-16) und Untersuchung der durch ungenaue Exzision des *P*-Elements entstandenen Fliegenlinien (Abb. 2-22) wurde ein PCR-Ansatz gewählt. Primer, die zur Analyse des *aeneas*-Lokus benötigt wurden, wurden mithilfe des Programmes OLIGO® 4.06 Primer Analysis Software (National Biosciences 1992) ermittelt und von den Firmen NAPS Göttingen GmbH (37079 Göttingen) und MWG-Biotech AG (85560 Ebersberg) synthetisiert.

Sequenzen der verwendeten Primer für die genomische PCR:*GC14648*-Region 5' zur ursprünglichen *P{lacW}*-Element-Insertion:

EX1-1UP (A): 5' TGT GAA CTG TGT AGC CGT AGC 3'  
P-Primer (P): 5' CGA CGG GAC CAC CTT ATG TTA TTT CAT CAT G 3'

*GC14648*-Region 3' zur ursprünglichen *P{lacW}*-Element-Insertion:

EX2-1LOW (B): 5' CAC CCA CGA ACG AAG GAA T 3'  
P-Primer (P): 5' CGA CGG GAC CAC CTT ATG TTA TTT CAT CAT G 3'

Analyse von Deletionen im Bereich der ursprünglichen *P{lacW}*-Element-Insertionsstelle:

EX1-1UP (A): 5' TGT GAA CTG TGT AGC CGT AGC 3'  
918LP (C): 5' CGG CGT CTG TTG TTT TGA TGT TGC T 3'

Die PCR wurde mit den Komponenten des Hot Star Taq Systems (QIAGEN) in der PCR-Maschine Gene Amp® 9700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Der PCR-Ansatz hatte ein Volumen von 50 µl und enthielt 250-500 ng genomische DNA als „Template“, jeweils 10 pM der entsprechenden Primer und 25 µl PCR-„Master Mix“ vom Hersteller.

Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1 x	95°C	15 min	Aktivierung
1 x	75°C	2 min	-
25 x	95°C	30 sec	Denaturierung
	60°C	1 min	„Annealing“
	68°C	2 min	Elongation
1 x	72°C	10 min	finale Elongation
1 x	4°C	∞	„Soak“

**Tab. 4-E:** PCR-Programm (genomische PCR)

#### 4.1.13 Präparation von poly(A)<sup>+</sup>-RNA

Zur Gewinnung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA für die Northern Blot-Analyse wurde aus 500-1000 µg Embryonen, Larven bzw. adulten Fliegen mithilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) Gesamt-RNA hergestellt. Dazu wurde das Minipräp-Protokoll für die Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischem Gewebe verwendet. Die Tiere wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem RNase-freien Plastikpistill homogenisiert. Danach wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Für die Aufreinigung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus der isolierten Gesamt-RNA wurde das Oligotex Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers benutzt.

#### 4.1.14 Northern-Hybridisierung

2 µg poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus Embryonen unterschiedlichen Alters, verschiedenen Larvenstadien bzw. adulten Fliegen wurde nach dem NorthernMax Protokoll (Ambion) auf ein denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel nach Protokoll Angaben weiterbehandelt: Die RNA wurde auf BrightStar-Plus Membranen (Ambion) geblottet und durch „Crosslink“ mit dem Stratalinker 1800 (Stratagene) an den Filter gebunden. Zur Hybridisierung der spezifischen RNA-Sonden wurde der ULTRAhyb-Puffer (Ambion) verwendet. Die Hybridisierung erfolgte in einem Volumen von 10 ml für 2 h, bei 65°C. Nach Waschen mit High Stringency Wash Solution #2 (Ambion) und Lufttrocknung des Filters wurden die markierten Transkripte durch Autoradiographie (4.1.8) sichtbar gemacht.



#### 4.1.15 Herstellung von „antisense“-RNA-Sonden

Für nicht-radioaktive Markierungen von RNA-Sonden mit DIG-UTP wurde das RNA-Labeling and Detection Kit (Roche) verwendet: 1 µg Matrizen-DNA, 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 2 µl DIG-RNA Labeling Mix, 0,5 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl), 2 µl DTT (100 mM) und 1 µl RNA-Polymerase (20 U) wurden mit H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt, kurz abzentrifugiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 µl DNaseI (Rnase-frei) hinzugefügt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die RNA-Sonde wurde mithilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für eine *in situ*-Hybridisierung wurden 2 µl der RNA-Sonde eingesetzt.

#### 4.1.16 Transkriptspezifische RT-PCR-Analyse der *aeneas*-RNA

Für die Analyse der *aeneas*-Expression in adulten Fliegen wurde eine transkriptspezifische RT-PCR mithilfe des Access RT-PCR System Kits (Promega) durchgeführt. Für eine Reaktion wurden 100 ng poly(A)<sup>+</sup>-RNA (4.1.13) von OreR- bzw. *l(3)l1233<sup>R80</sup>*-Fliegen eingesetzt. Die RT-PCR wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

##### Sequenzen der verwendeten Primer für die RT-PCR:

##### *aeneas*-Oligonukleotide aus Exon 1 bzw. Exon 2:

5ex1 (A<sup>+</sup>): 5' GGA GAA CGG TAG ACG TTG C 3'  
 EX2-1LOW (B<sup>+</sup>): 5' CAC CCA CGA ACG AAG GAA T 3'  
 ex2-low (C<sup>+</sup>): 5' TGC TTT CTT GAA CTC CTC T 3'

Zyklen	Temperatur	Zeit	Reaktion
1 x	48°C	45 min	rev. Transkription
1 x	94°C	2 min	AMV-Inaktivierung
25 x	94°C	30 sec	Denaturierung
	60°C	1 min	„Annealing“
	68°C	2 min	Elongation
1 x	68°C	7 min	finale Elongation
1 x	4°C	∞	„Soak“

**Tab. 4-F:** PCR-Programm (RT-PCR)

## **4.2 Histologie und Embryologie**

### **4.2.1 *In situ*-Hybridisierung an Embryonen**

Die räumliche und zeitliche Verteilung von Transkripten während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* wurde durch *in situ*-Hybridisierung an ganzen Embryonen untersucht (Tautz und Pfeifle, 1989). Auf einer Apfelsaftagarplatte abgelegte Embryonen wurden zunächst nach dem Absammeln dechorioniert [3 min, 50% Chlorbleiche (Klorix)], für 20 min auf dem Schüttler fixiert [8 ml Heptan; 1,6 ml Fixierlsg. (100 mM HEPES; 2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM EGTA, pH 6,9); 0,5 ml Formaldehyd (37%)] und darauf durch osmotischen Schock (Ausschütteln in Heptan/Methanol 1:1) devitellinisiert. Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle folgenden Schritte unter Rotation auf einem Drehrad bei RT durchgeführt. Etwa 30 µl Embryonen wurden in PBT 3 x 5 min gewaschen, danach 20 min in PBS/Formaldehyd (4%) fixiert, anschließend 3 x 5 min mit PBT gewaschen und danach 1 min mit Proteinase K (20 ng/ml in PBT) behandelt. Nach drei aufeinanderfolgenden Waschschritten in PBT wurden die Embryonen in PBS/Formaldehyd (4%) für 20 min postfixiert und 5 x 5 min in PBT gewaschen. Die schrittweise Überführung in Hybridisierungslsg. A (50% Formamid; 5 x SSC; 0,1% Tween20; 100 mg/ml Heringssperma-DNA; 50 mg/ml Heparin) erfolgte in jeweils 10 minütigen Waschschritten:

- I. (1:1) PBT/Hybridisierungslsg. B (5 x SSC, 50% Formamid)
- II. reine Hybridisierungslsg. B
- III. Hybridisierungslsg. A/Hybridisierungslsg. B (1:1)
- IV. reine Hybridisierungslsg. A.

Nach der folgenden Vorhybridisierung in Hybridisierungslsg. A bei 65°C, 1 h erfolgte die Hybridisierung in 30 µl Hybridisierungslsg. A mit 1 – 10 µl DIG-markierter „antisense“-RNA-Sonde üN bei 65°C im Wasserbad. Anschließend wurde zunächst mit Hybridisierungslsg. A 1 x bei 65°C 10 min und darauf mit Hybridisierungslsg. B 2 x 15 min bei 65°C gewaschen, danach wurde 1 x 15 min in PBT/Hybridisierungslsg. B (1:1) und 4 x 15 min in PBT gewaschen. Zur Signaldetektion wurden die Embryonen 2 h mit präabsorbiertem anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugat (1:2000 in PBT verdünnt; Boehringer) inkubiert, erneut 6 x 15 min mit PBT gewaschen und in AP-Puffer (20 mM Tris pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>) (3 x 5 min) überführt. Die Entwicklung der Färbung erfolgte durch Zugabe von 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP zu 1 ml AP-Puffer. Die Farbreaktion wurde durch Waschen in PBT 3 x 5 min gestoppt, die Embryonen schrittweise in 70%igem, bzw. 100%igem EtOH dehydriert und in 30 – 50 µl Canada Balsam (Sigma) auf einem Objektträger eingebettet.

#### 4.2.2 Antikörperfärbung von Embryonen

30 µl fixierte Embryonen (4.2.1) wurden durch 3 x 5 minütiges Waschen mit 1 ml BBT (10 mM Tris pH 6,9; 55 mM NaCl; 7 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM CaCl<sub>2</sub>; 20 mM Glucose; 50 mM Saccharose; 0,1% BSA; 0,1% Tween20) rehydriert und üN bei 4°C mit 500 µl präabsorbiertem Primärantikörper (Verdünnung 1:10 - 1:5000) inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden auf einem Drehrad bei RT durchgeführt. Ungebundener Antikörper wurde 4 x 5 min mit 1 ml BBT und 2 x 20 min mit 500 µl BBT + 10 µl (2%) des entsprechenden Serums ausgewaschen. Die Embryonen wurden danach 2 h mit 10 µl biotinyliertem sekundären Antikörper (Vectastain™ Elite ABC, Camon) in 380 µl BBT + 10 µl Serum inkubiert. Anschließend wurde 2 x 5 min in 1 ml PBT gewaschen, 30 min mit Avidin-Meerrettichperoxidase-Komplex [Lsg. A und B, jeweils 10 µl (2% V/V) – 30 min bei RT vorinkubiert] in 480 µl PBT inkubiert und erneut 3 x 10 min mit 1 ml PBT gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 10 µl DAB (Diaminobenzidin; 10 mg/ml) und 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:100 in PBT) in 1 ml Volumen gestartet. Die gefärbten Embryonen (5-15 min) wurden 2 x 10 min in 1 ml PBT gewaschen, schrittweise dehydriert (2 x 15 min 70% EtOH; 2 x 15 min 100% EtOH) und in Canada Balsam eingebettet.

Das Protokoll für den Nachweis fluoreszenzgekoppelter Antikörper im konfokalen Mikroskop ist bis zur Primärantikörper-Inkubation identisch mit dem Protokoll für die chemische Farbreaktion. Für konfokale Mikroskopie wurde dann 6 x 10 min in BBT, 2 x 10 min in PBT und 2 x 5 min in PBS gewaschen. Die Embryonen sanken üN bei 4°C in einem Eppendorfgefäß in 500 µl Mowiol (50%) ab. Die abgesunkenen Embryonen wurden auf einen Objektträger überführt, das 50%ige Mowiol weitestgehend abpipettiert und 30 - 50 µl frisches Mowiol auf die Embryonen pipettiert. Das Präparat wurde mit einem Deckglas versiegelt und an einem konfokalen Mikroskop (CLM500, ZEISS) untersucht.

Antikörper	Eingesetzte Verdünnung	Referenz
Kaninchen-anti-β-Gal	1 : 1000	CAPPEL
Maus-anti-β-Gal	1 : 1000	CAPPEL
Kaninchen-anti-Vasa	1 : 2000	P. Lasko (McGill University, Montréal, Canada)
Kaninchen-anti-MHC	1 : 2000	D. P. Kiehart, (Duke University, Durham, USA)

**Tab. 4-G:** Liste der verwendeten Primärantikörper

### 4.3 Genetik

Zur Zucht und Haltung der verschiedenen *Drosophila*-Stämme wurden Standardmethoden verwendet (Roberts, 1986).

#### 4.3.1 Fliegenstämme

Als Wildtypstamm wurde *Drosophila melanogaster* Oregon R benutzt. Die in **Tab. 4-H** beschriebenen Mutanten -, Marker- und „Balancer“-Stämme wurden verwendet. Die in der Beschreibung der einzelnen Stämme verwendeten Gen- und Allelsymbole sind in Lindsley und Zimm (1992) bzw. FlyBase (1999) beschrieben.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>P{EP}36553</i>	<i>P{EP}</i> -Element-Integration im 1. Intron von <i>aeneas</i> (homozygot lebensfähig)	DeveloGen AG (Göttingen)
<i>l(3)L1233</i>	<i>P{lacW}</i> -Element Integration im 1. Intron von <i>aeneas</i> (homozygot letal)	Stocksammlung Bloomington
<i>l(3)L1233<sup>R80</sup></i>	<i>P{lacW}</i> -Element-Integration im 1. Intron von <i>aeneas</i> (homozygot lebensfähig)	Andreas Molitor - diese Arbeit - (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abt. Molekulare Entwicklungsbiologie)
$\Delta l(3)L1233^{R80-C2}$	<i>P{lacW}</i> -Element-Exzisions-Linie (1.476 bp Deletion im <i>aeneas</i> -Gen: homozygot semiletal)	
UAST <sub>eGFP-aen</sub> (Linie 6A)	transgene Fliegenlinie für das UAST <sub>eGFP-aeneas</sub> -Konstrukt (ORF von <i>aeneas</i> mit eGFP)	
<i>Df(3R)Z1</i>	Defizienz, die das gesamte <i>aeneas</i> -Gen deletiert (82A5-6; 82E4)	Stocksammlung Bloomington
<i>Df(3R)XM3</i>	Defizienz, die das gesamte <i>aeneas</i> -Gen deletiert (82A3-6; 82B)	Stocksammlung Bloomington
<i>D / TM3,Sb,Ser</i>	„Balancer“-Linie für das 3. Chromosom	Stocksammlung Bloomington
<i>Sb(Δ2,3) / TM6</i>	„jump starter“-Linie (3. Chromosom)	Stocksammlung Bloomington

**Tab. 4-H:** Fliegenstämme

#### 4.3.2 Keimbahntransformation

Die Technik der *P*-Element-vermittelten Keimbahn-Transformation wurde angewandt, um klonierte DNA-Fragmente in das Genom von *Drosophila* einzuführen (Rubin und Spradling, 1982). Je nach Anwendung standen dazu verschiedene *P*-Element-Vektoren zur Verfügung

(**Tab. 4-B**). Die zu transformierende DNA wurde in *E. coli* DJH5 $\alpha$  vermehrt und mithilfe des QIAGEN Plasmid Kits gereinigt (**4.1.5**). Die DNA wurde auf eine Konzentration von 300 mg/ml eingestellt und mit 50 mg/ml des Plasmids  $\Delta 2-3$  (Laski et al., 1986) versetzt, das als Quelle für die *P*-Element-Transposase diente. Nach Koinjektion der Plasmide in frühe Blastoderm-Embryonen des Fliegenstamms *w*, *sn*<sup>3</sup> wurden die sich entwickelnden Fliegen mit *w*, *sn*<sup>3</sup>-Fliegen zurückgekreuzt. Transgene Einzellinien wurden mit Fliegen etabliert, die auf Grund der Expression des auf dem *P*-Element-Plasmid enthaltenen Markergens (*w*) die Integration des *P*-Elements im Genom anzeigten. Die Injektionen der *P*-Element-Konstrukte wurden von Sonja Fellert bzw. Ursula Jahns-Meyer am MPI für biophysikalische Chemie (Göttingen) durchgeführt.

### **4.3.3 *P{lacW}*-Element-Exzision**

Zum Test auf Revertierbarkeit und zur Herstellung von genomischen Deletionen im *aeneas*-Gen wurde das *P{lacW}*-Element der Linie *l(3)L1233* durch Einkreuzen eines „jump starter“-Chromosoms (Robertson et al., 1988) mobilisiert. Das Kreuzungsschema ist in Abb. **2-21** (Ergebnisse) dargestellt. Die verwendete „jump starter“-Linie *yw; Sb( $\Delta 2,3$ )/TM6* trägt das Transposase-Gen auf dem 3. Chromosom. Die „jump starter“-Linie wurde mit der *P{lacW}*-Element-Insertionslinie gekreuzt. Aus der F<sub>1</sub>-Generation wurden *Sb*-Fliegen mit der „Balancer“-Linie *yw; D/TM3,Sb,Ser* gekreuzt. Aus der F<sub>2</sub>-Generation wurden die Fliegen, die phänotypisch *w*<sup>-</sup> waren und somit wahrscheinlich das *P{lacW}*-Element verloren hatten, in Einzelkreuzungen mit *yw; D/TM3,Sb,Ser* gesetzt. In der F<sub>3</sub>-Generation wurden Männchen von *P{lacW}*-Element-Fliegen mit deletiertem *w*-Gen und *TM3,Sb,Ser* „Balancer“-Chromosom mit Jungfrauen derselben Linie gekreuzt, um unabhängige Fliegenlinien zu etablieren. Ebenfalls wurden homozygote Tiere ohne Marker auf einen Phänotyp durchmustert, der durch eine ungenaue Exzision des *P{lacW}*-Elements verursacht werden konnte. Unter der Annahme, dass das *aeneas*-Gen für die Lebensfähigkeit eine essenzielle, zygotische Funktion hat, konnten folgende Schlüsse gezogen werden: Traten in der F<sub>4</sub>-Generation Fliegen ohne *Sb*- und *Ser*-Marker auf, so war eine mit dem Verlust des *P{lacW}*-Elements verbundene Reversion zum Wildtyp hin erfolgt. Traten jedoch lediglich Fliegen mit *Sb*- und *Ser*-Marker auf, so war durch die *P{lacW}*-Element-Remobilisierung eine genomische Deletion erzeugt worden.

### **4.3.4 Ektopische Expression von *aeneas* mithilfe des Gal4/UAS-Systems**

Für die ektopische Expression von *aeneas* in verschiedenen embryonalen Regionen wurde das Gal4/UAS-System (Brand und Perrimon, 1993) verwendet. Die eine Komponente des Systems ist eine transgene Fliegenlinie, bei der das Gal4-Protein unter der Kontrolle eines regulatorischen Promotorelements exprimiert wird (Treiberlinie). Die zweite Komponente des

Systems (Ziellinie) ist ebenfalls ein transgener Fliegenstamm, bei dem das zu untersuchende Zielgen unter der Kontrolle von 5 hintereinandergeschalteten Gal4-bindenden „upstream activating sequences“ (UAS) aus der Hefe steht. Die in Tab. 4-I aufgeführten Fliegenstämme wurden benutzt. Die Nachkommen aus diesen Kreuzungen wurden bei 25°C oder 29°C herangezogen. Da die Aktivität des Gal4-Genprodukts ein temperaturabhängiges Verhalten aufweist, wurde so eine Feinregulierung der Gal4-Aktivität hinsichtlich der Intensität und des Zeitpunkts der Genaktivierung ermöglicht.

Bezeichnung	Gewebespezifität der Treiberlinie bzw. Verwendungszweck der Ziellinie	Chromosom	Referenz
<i>sr239</i> -Gal4	Apodeme und ZNS	III.	O. Piepenburg (MPI für biophys. Chemie, Göttingen)
<i>sr239ΔPan</i> -Gal4	Apodeme bzw. anterior zur <i>en</i> -Domäne und ZNS	III.	
<i>en</i> Gal4	<i>engrailed</i> -Expressionsdomäne	-	A. Brand (Cambridge University, UK)
UAST <sub>eGFP-<i>aen</i></sub> 6A	Ektopische Expression von eGFP- <i>aeneas</i>	-	Andreas Molitor - diese Arbeit -
UAST <sub><i>CG4963</i></sub>	Ektopische Expression von <i>CG4963</i>	-	

**Tab. 4-I:** Fliegenstämme für Gal4/UAS-Experimente

## **5 Zusammenfassung**

Zur Identifizierung von Faktoren, die bei *Drosophila* zur Kontrolle von gerichteten Zellmigrations- bzw. Wachstumsprozessen beitragen, wurde ein Gal4-vermittelter Fehlexpressions-„Screen“ durchgeführt. Es wurden ca. 4000 sogenannte *P{EP}*-Insertionen untersucht, bei denen endogene Gene mithilfe von Gal4-Treiberlinien in der Epidermis exprimiert wurden. So konnten Genaktivitäten ermittelt werden, deren Fehlexpression das gerichtete Auswachsen der Muskelvorläuferzellen im *Drosophila*-Embryo beeinflusst und zu einer Veränderung des normalerweise stereotypen Muskelmusters führt. Bei 50 (1,25%) der insgesamt 4000 durchmusterten Linien verursachte die Fehlexpression eine Störung des Musters der Körperwandmuskulatur in Verbindung mit embryonaler Letalität. Die identifizierten Genprodukte umfassen Rezeptoren, Transmembranproteine, Transkriptionsfaktoren und Enzyme.

Ferner wurden Faktoren gefunden, die normalerweise nicht am Auswachsen der Muskeln beteiligt sind. Ein Beispiel hierfür ist das näher charakterisierte Kandidatengen, welches *aeneas* genannt wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität des *aeneas*-Gens Migrationsprozesse beeinflussen kann. Normalerweise ist *aeneas*-Aktivität an der Migration der Polzellen zum Entstehungsort der Gonade beteiligt. Das *aeneas*-Genprodukt ist Mitglied einer neuen, funktionell uncharakterisierten Proteinklasse, welche in so verschiedenen Spezies wie *A. thaliana* und *H. sapiens* konserviert ist. Das Protein weist eine Domäne auf, die Ähnlichkeit zur Konsensussequenz der Enzymklasse der 5-Formyltetrahydrofolat Cyclo-Ligasen zeigt.

Die Integration eines *P{lacW}*-Elements in das *aeneas*-Gen induziert zwar keine Letalität, führt aber bei 25% der homozygoten Embryonen zu einer Störung der Polzellwanderung. Im Gegensatz zur Wildtypsituation und zu anderen Migrationsmutanten setzt die Wanderung der Polzellen deutlich verfrüht ein. Der Phänotyp der *aeneas*-Mutante deutet auf eine Funktion des Proteins bei Zelladhäsionsvorgängen zwischen Polzellen und somatischen Zellen hin.. Durch die Remobilisierung des *P*-Elements, verbunden mit einer ungenauen Exzision des *P*-Elements wurde eine 1,4 kb große Deletion im *aeneas*-Lokus erzeugt. Diese Deletion führt zum Verlust eines großen Teils des offenen Leserahmens und stellt somit wahrscheinlich eine Nullmutation dar. Bei dieser Mutation sind sowohl die Penetranz, als auch der Migrationsdefekt verstärkt. Dennoch ist die Deletions-Linie lebensfähig und fertil. Die unvollständige Penetranz des *aeneas*-Phänotyps deutet auf eine redundante Absicherung der *Anaeas*-Funktion durch andere Genaktivitäten hin.



## 6 Literaturverzeichnis

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95.

Adams, M. D., and Sekelsky, J. J. (2002). From sequence to phenotype: reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 3, 189-98.

Anderson, K. V., and Nüsslein-Volhard, C. (1984). Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA, *Nature* 311, 223-7.

Anderson, K. V., Jürgens, G., and Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the *Toll* gene product. *Cell* 42, 779-89.

Appling, D. R. (1991). Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *Faseb J* 5, 2645-51.

Arora, K., Dai, H., Kazuko, S. G., Jamal, J., O'Connor, M. B., Letsou, A., and Warrior, R. (1995). The *Drosophila schnurri* gene acts in the Dpp/TGF beta signaling pathway and encodes a transcription factor homologous to the human MBP family, *Cell* 81, 781-90.

Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M., and Baylies, M. K. (1998). The *muscleblind* gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by *Dmef2*. *Dev Biol* 195, 131-43.

Asaoka-Taguchi, M., Yamada, M., Nakamura, A., Hanyu, K., and Kobayashi, S. (1999). Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 1, 431-7.

Azpiazu, N., Lawrence, P. A., Vincent, J. P., and Frasch, M. (1996). Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev* 10, 3183-94.

Balogopalan, L., Keller, C. A., and Abmayr, S. M. (2001). Loss-of-function mutations reveal that the *Drosophila nautilus* gene is not essential for embryonic myogenesis or viability. *Dev Biol* 231, 374-82.

Bate, C. M. (1976). Pioneer neurones in an insect embryo. *Nature* 260, 54-6.

- Bate, M. (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* 110, 791-804.
- Bate, M., and Rushton, E. (1993). Myogenesis and muscle patterning in *Drosophila*. *C R Acad Sci III* 316, 1047-61. Early derangement of *twist* expression in *wingless* mutants. The possible role of the ectoderm in patterning *Drosophila* mesoderm is discussed.
- Baylies, M. K., and Bate, M. (1996). *twist*: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science* 272, 1481-4.
- Baylies, M. K., and Michelson, A. M. (2001). Invertebrate myogenesis: looking back to the future of muscle development. *Curr Opin Genet Dev* 11, 431-9.
- BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project): <http://www.fruitfly.org/>
- Beiman, M., Shilo, B. Z., and Volk, T. (1996). Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev* 10, 2993-3002.
- Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R. K., and Gehring, W. J. (1989). *P*-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev* 3, 1288-300.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68, 729-77.
- Bertrand, R., MacKenzie, R. E., and Jolivet, J. (1987). Human liver methenyltetrahydrofolate synthetase: improved purification and increased affinity for folate polyglutamate substrates. *Biochim Biophys Acta* 911, 154-61.
- Birchler, J. A., Bhadra, U., Bhadra, M. P., and Auger, D. L. (2001). Dosage-dependent gene regulation in multicellular eukaryotes: implications for dosage compensation, aneuploid syndromes, and quantitative traits, *Dev Biol* 234, 275-88.
- Bloomington *Drosophila* Stock Center. <http://flystocks.bio.indiana.edu/>
- Bodmer, R., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1990). A new homeobox-containing gene, *msh-2*, is transiently expressed early during mesoderm formation of *Drosophila*, *Development* 110, 661-9.
- Bodmer, R., and Frasch, M. (1999). *Heart Development* (Academic Press, San Diego, London, New York), 65-90.
- Bogdan, S., and Klämbt, C. (2001). Epidermal growth factor receptor signaling, *Curr Biol* 11, R292-5.
- Bonneton, C., Sibarita, J. B., and Thiery, J. P. (1999). Relationship between cell migration and cell cycle during the initiation of epithelial to fibroblastoid transition, *Cell Motil Cytoskeleton* 43, 288-95.
- Borkowski, O. M., Brown, N. H., and Bate, M. (1995). Anterior-posterior subdivision and the diversification of the mesoderm in *Drosophila*. *Development* 121, 4183-93.

- Bour, B. A., Chakravarti, M., West, J. M., and Abmayr, S. M. (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev* 14, 1498-511.
- Bour, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., Abmayr, S. M., and Nguyen, H. T. (1995). *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev* 9, 730-41.
- Bourgouin, C., Lundgren, S. E., and Thomas, J. B. (1992). *apterous* is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron* 9, 549-61.
- Boyle, M., and DiNardo, S. (1995). Specification, migration and assembly of the somatic cells of the *Drosophila* gonad. *Development* 121, 1815-25.
- Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-15.
- Breitwieser, W., Markussen, F. H., Horstmann, H., and Ephrussi, A. (1996). Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev* 10, 2179-88.
- Broihier, H. T., Moore, L. A., Van Doren, M., Newman, S., and Lehmann, R. (1998). *zfh-1* is required for germ cell migration and gonadal mesoderm development in *Drosophila*. *Development* 125, 655-66.
- Brönner, G., and Jäckle, H. (1996). Regulation and function of the terminal gap gene *huckebein* in the *Drosophila* blastoderm. *Int J Dev Biol* 40, 157-65.
- Brown, N. H. (2000). Cell-cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. *Matrix Biol* 19, 191-201.
- Buff, E., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Jimenez, F., and Michelson, A. M. (1998). Signalling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors. *Development* 125, 2075-86.
- Callahan, C. A., Bonkovsky, J. L., Scully, A. L., and Thomas, J. B. (1996). *derailed* is required for muscle attachment site selection in *Drosophila*. *Development* 122, 2761-7.
- Campos-Ortega, J. A. (1995). Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Neurobiol* 10, 75-89.
- Campos-Ortega, J. A., and Hartenstein, V. (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. (Springer-Verlag: Berlin ).
- Carey, D. J. (1997). Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* 327, 1-16.
- Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F., and Michelson, A. M. (1998). Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev* 12, 3910-22.
- Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jimenez, F., and Chia, W. (1998). *Inscuteable* and *numb* mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev* 12, 304-15.

Cohen, L., Henzel, W. J., and Baeuerle, P. A. (1998). IKAP is a scaffold protein of the IkappaB kinase complex, *Nature* 395, 292-6.

Cooley, L., Verheyen, E., and Ayers, K. (1992). *chickadee* encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis, *Cell* 69, 173-84.

Costa, M., Sweeton, D., and Wieschaus, E. (1993). Gastrulation in *Drosophila*: Cellular mechanisms of morphogenetic movements. The development of *Drosophila melanogaster*. (Cold Spring Harbor Laboratories: Long Island NY), 425-465.

Crozatier, M., and Vincent, A. (1999). Requirement for the *Drosophila* COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle: transcriptional response to Notch signalling. *Development* 126, 1495-504.

D'Alessio, M., and Frasch, M. (1996). *msh* may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mech Dev* 58, 217-31.

Delattre, M., Anxolabehere, D., and Coen, D. (1995). Prevalence of localized rearrangements vs. transpositions among events induced by *Drosophila* P element transposase on a P transgene, *Genetics* 141, 1407-24.

Deshpande, G., Calhoun, G., Yanowitz, J. L., and Schedl, P. D. (1999). Novel functions of *nanos* in downregulating mitosis and transcription during the development of the *Drosophila* germline. *Cell* 99, 271-81.

Deshpande, G., Swanhart, L., Chiang, P., and Schedl, P. (2001). Hedgehog signaling in germ cell migration. *Cell* 106, 759-69.

Dixon, K. E. (1994). Evolutionary aspects of primordial germ cell formation. *Ciba Found Symp* 182, 92-110; discussion 110-20.

Doberstein, S. K., van Vactor, D. L., and Goodman, C. S. (1994). Genetic interactions between the *Drosophila* prolifin gene (*chickadee*) and EGF receptor signal transduction cascade components. *Molec. Biol. Cell* 5, 270a.

Dorn, R., Morawietz, H., Reuter, G., and Saumweber, H. (1993). Identification of an essential *Drosophila* gene that is homologous to the translation initiation factor eIF-4A of yeast and mouse, *Mol Gen Genet* 237, 233-40.

Dossenbach, C., Rock, S., and Affolter, M. (2001). Specificity of FGF signaling in cell migration in *Drosophila*. *Development* 128, 4563-72.

Driever, W. (1993). Maternal control of anterior development in the *Drosophila* embryo. The Development of *Drosophila melanogaster*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 301-324.

Duchek, P., and Rorth, P. (2001). Guidance of cell migration by EGF receptor signaling during *Drosophila* oogenesis. *Science* 291, 131-3.

Duchek, P., Somogyi, K., Jekely, G., Beccari, S., and Rorth, P. (2001). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor. *Cell* 107, 17-26.

Dunin-Borkowski, O. M., and Brown, N. H. (1995). Mammalian CD2 is an effective heterologous marker of the cell surface in *Drosophila*. *Dev Biol* 168, 689-93.

- Edgar, B. A., and Orr-Weaver, T. L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less, *Cell* 105, 297-306.
- Endo, K., Akiyama, T., Kobayashi, S., and Okada, M. (1996). Degenerative spermatocyte, a novel gene encoding a transmembrane protein required for the initiation of meiosis in *Drosophila* spermatogenesis, *Mol Gen Genet* 253, 157-65.
- Ephrussi, A., and Lehmann, R. (1992). Induction of germ cell formation by *oskar*. *Nature* 358, 387-92.
- ExPASy: <http://www.expasy.ch/>
- FlyBase (1999). The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res.* 27:85-88. <http://flybase.bio.indiana.edu/>
- Foe, V. E., and Alberts, B. M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci* 61, 31-70.
- Forbes, A., and Lehmann, R. (1999). Cell migration in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 9, 473-8.
- Forbes, A., and Lehmann, R. (1998). Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development* 125, 679-90.
- Frasch, M. (1999). Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 9, 522-9.
- Frommer, G., Vorbrüggen, G., Pasca, G., Jäckle, H., and Volk, T. (1996). Epidermal Egr-like zinc finger protein of *Drosophila* participates in myotube guidance. *Embo J* 15, 1642-9.
- Gerttula, S., Jin, Y. S., and Anderson, K. V. (1988). Zygotic expression and activity of the *Drosophila Toll* gene, a gene required maternally for embryonic dorsal-ventral pattern formation. *Genetics* 119, 123-33.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J. B., Doe, C. Q., and Michelson, A. M. (1996). *heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 10, 3003-17.
- Glazer, L., and Shilo, B. Z. (2001). Hedgehog signaling patterns the tracheal branches. *Development* 128, 1599-606.
- Graner, M. W., Bunch, T. A., Baumgartner, S., Kerschen, A., and Brower, D. L. (1998). Splice variants of the *Drosophila* PS2 integrins differentially interact with RGD-containing fragments of the extracellular proteins Tigrin, Ten-m, and D-Laminin  $\alpha 2$ . *J Biol Chem* 273, 18235-41.
- Haerry, T. E., Heslip, T. R., Marsh, J. L., and O'Connor, M. B. (1997). Defects in glucuronate biosynthesis disrupt Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* 124, 3055-64.
- Halfon, M. S., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Sackerson, C. M., Jimenez, F., Baylies, M. K., and Michelson, A. M. (2000). Ras pathway specificity is determined by the integration of multiple signal-activated and tissue-restricted transcription factors. *Cell* 103, 63-74.

- Halfon, M. S., Hashimoto, C., and Keshishian, H. (1995). The *Drosophila Toll* gene functions zygotically and is necessary for proper motoneuron and muscle development. *Dev Biol* 169, 151-67.
- Halfon, M. S., and Keshishian, H. (1998). The *Toll* pathway is required in the epidermis for muscle development in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 199, 164-74.
- Hashimoto, C., Gerttula, S., and Anderson, K. V. (1991). Plasma membrane localization of the Toll protein in the syncytial *Drosophila* embryo: importance of transmembrane signaling for dorsal-ventral pattern formation. *Development* 111, 1021-8.
- Howard, K. (1998). Developmental biology. Attractive genetics. *Nature* 396, 406-7.
- Huang, A. M., Rusch, J., and Levine, M. (1997). An anteroposterior Dorsal gradient in the *Drosophila* embryo, *Genes Dev* 11, 1963-73.
- Huennekens, F. M., Duffy, T. H., and Vitols, K. S. (1987). Folic acid metabolism and its disruption by pharmacologic agents, *NCI Monogr*, 1-8.
- Illmensee, K., and Mahowald, A. P. (1974). Transplantation of posterior polar plasma in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1016-20.
- Irvine, K. D., and Wieschaus, E. (1994). *fringe*, a Boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* 79, 595-606.
- Jagla, T., Bellard, F., Lutz, Y., Dretzen, G., Bellard, M., and Jagla, K. (1998). *ladybird* determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles. *Development* 125, 3699-708.
- Jagla, K., Bellard, M., and Frasch, M. (2001). A cluster of *Drosophila* homeobox genes involved in mesoderm differentiation programs, *Bioessays* 23, 125-33.
- Jaglarz, M. K., and Howard, K. R. (1994). Primordial germ cell migration in *Drosophila melanogaster* is controlled by somatic tissue. *Development* 120, 83-9.
- Jaglarz, M. K., and Howard, K. R. (1995). The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development* 121, 3495-503.
- Johnson Hamlet, M. R., and Perkins, L. A. (2001). Analysis of Corkscrew signaling in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during myogenesis. *Genetics* 159, 1073-87.
- Keith, F. J., and Gay, N. J. (1990). The *Drosophila* membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. *Embo J* 9, 4299-306.
- Khush, R. S., Leulier, F., and Lemaitre, B. (2001). *Drosophila* immunity: Two paths to NF-kappaB, *Trends Immunol* 22, 260-4.
- Kidd, T., Bland, K. S., and Goodman, C. S. (1999). Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila*. *Cell* 96, 785-94.

- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., and Tear, G. (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92, 205-15.
- Kim, Y. S., Ryu, J. H., Han, S. J., Choi, K. H., Nam, K. B., Jang, I. H., Lemaitre, B., Brey, P. T., and Lee, W. J. (2000). Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J Biol Chem* 275, 32721-7.
- Kipreos, E. T., and Pagano, M. (2000). The F-box protein family, *Genome Biol* 1, REVIEWS3002.
- Kirby, R. J., Hamilton, G. M., Finnegan, D. J., Johnson, K. J., and Jarman, A. P. (2001). *Drosophila* homolog of the myotonic dystrophy-associated gene, *SIX5*, is required for muscle and gonad development. *Curr Biol* 11, 1044-9.
- Klämbt, C., Glazer, L., and Shilo, B. Z. (1992). *breathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells, *Genes Dev* 6, 1668-78.
- Knirr, S., Azpiazu, N., and Frasch, M. (1999). The role of the NK-homeobox gene *slouch* (*S59*) in somatic muscle patterning. *Development* 126, 4525-35.
- Knirr, S., and Frasch, M. (2001). Molecular Integration of Inductive and Mesoderm-Intrinsic Inputs Governs *even-skipped* Enhancer Activity in a Subset of Pericardial and Dorsal Muscle Progenitors. *Dev Biol* 238, 13-26.
- Knoblich, J. A., and Lehner, C. F. (1993). Synergistic action of *Drosophila* cyclins A and B during the G2-M transition, *Embo J* 12, 65-74.
- Kobayashi, S., Yamada, M., Asaoka, M., and Kitamura, T. (1996). Essential role of the posterior morphogen *nanos* for germline development in *Drosophila*. *Nature* 380, 708-11.
- Kramer, S. G., Kidd, T., Simpson, J. H., and Goodman, C. S. (2001). Switching repulsion to attraction: changing responses to slit during transition in mesoderm migration. *Science* 292, 737-40.
- Kraut, R., Menon, K., and Zinn, K. (2001). A gain-of-function screen for genes controlling motor axon guidance and synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol* 11, 417-30.
- Kusch, T., and Reuter, R. (1999). Functions for *Drosophila brachyenteron* and *forkhead* in mesoderm specification and cell signalling. *Development* 126, 3991-4003.
- Laski, F. A., Rio, D. C., and Rubin, G. M. (1986). Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* 44, 7-19.
- Lasko, P. F., and Ashburner, M. (1990). Posterior localization of Vasa protein correlates with, but is not sufficient for, pole cell development. *Genes Dev* 4, 905-21.
- Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-69.
- Lawson, M. A., and Maxfield, F. R. (1995). Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377, 75-9.



- Lee, T., Hacohen, N., Krasnow, M., and Montell, D. J. (1996). Regulated Breathless receptor tyrosine kinase activity required to pattern cell migration and branching in the *Drosophila* tracheal system. *Genes Dev* 10, 2912-21.
- Lehner, C. F., and O'Farrell, P. H. (1989). Expression and function of *Drosophila cyclin A* during embryonic cell cycle progression, *Cell* 56, 957-68.
- Lehmann, R., and Nüsslein-Volhard, C. (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of *oskar*, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell* 47, 141-52.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-83.
- Leptin, M. (1999). Gastrulation in *Drosophila*: the logic and the cellular mechanisms. *Embo J* 18, 3187-92.
- Leptin, M., and Grunewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73-84.
- Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B. M., Schulz, R. A., and Olson, E. N. (1995). Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* 267, 688-93.
- Lin, X., Buff, E. M., Perrimon, N., and Michelson, A. M. (1999). Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development* 126, 3715-23.
- Lin, X., and Perrimon, N. (1999). Dally cooperates with *Drosophila* Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature* 400, 281-4.
- Lindsley, D. L., and Zimm, G. G. (1992). The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press.
- Liu, W., Litwack, E. D., Stanley, M. J., Langford, J. K., Lander, A. D., and Sanderson, R. D. (1998). Heparan sulfate proteoglycans as adhesive and anti-invasive molecules. Syndecans and glypican have distinct functions. *J Biol Chem* 273, 22825-32.
- Lord, P. C., Lin, M. H., Hales, K. H., and Storti, R. V. (1995). Normal expression and the effects of ectopic expression of the *Drosophila muscle segment homeobox (msh)* gene suggest a role in differentiation and patterning of embryonic muscles. *Dev Biol* 171, 627-40.
- Lu, B., Rothenberg, M., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1998). Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetric localization in *Drosophila* neural and muscle progenitors. *Cell* 95, 225-35.
- Luskey, K. L. (1988). Regulation of cholesterol synthesis: mechanism for control of HMG CoA reductase. *Recent Prog Horm Res* 44, 35-51.
- Mahowald, A. P. (2001). Assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Int Rev Cytol* 203, 187-213.
- Manning, G., and Krasnow, M. A. (1993). Development of the *Drosophila* tracheal system. The Development of *Drosophila melanogaster*. (Cold Spring Harbor Press), 609-685.

- Martin-Bermudo, M. D., and Brown, N. H. (2000). The localized assembly of extracellular matrix integrin ligands requires cell-cell contact. *J Cell Sci* 113, 3715-23.
- Marty, T., and Lehmann, R. (2002). Analysis of the transepithelial migration of *Drosophila* germ cells., *A Dros Res Conf* 43 644B.
- Maxton Küchenmeister, J., Handel, K., Schmidt-Ott, U., Roth, S., and Jäckle, H. (1999). Toll homologue expression in the beetle *tribolium* suggests a different mode of dorsoventral patterning than in *Drosophila* embryos. *Mech Dev* 83, 107-14.
- McNeill, H. (2000). Sticking together and sorting things out: adhesion as a force in development. *Nat Rev Genet* 1, 100-8.
- Metzger, R. J., and Krasnow, M. A. (1999). Genetic control of branching morphogenesis. *Science* 284, 1635-9.
- Miklos, G. L., and Rubin, G. M. (1996). The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. *Cell* 86, 521-9.
- Montell, D. J. (1999). Developmental regulation of cell migration. Insight from a genetic approach in *Drosophila*. *Cell Biochem Biophys* 31, 219-29.
- Montell, D. J. (1999). The genetics of cell migration in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* development. *Development* 126, 3035-46.
- Montell, D. J., Rorth, P., and Spradling, A. C. (1992). *slow border cells*, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP. *Cell* 71, 51-62.
- Moore, L. A., Broihier, H. T., Van Doren, M., Lunsford, L. B., and Lehmann, R. (1998). Identification of genes controlling germ cell migration and embryonic gonad formation in *Drosophila*. *Development* 125, 667-78.
- Morisato, D., and Anderson, K. V. (1995). Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Annu Rev Genet* 29, 371-99.
- Morisato, D., and Anderson, K. V. (1994). The *spatzle* gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell* 76, 677-88.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., and Zlotnik, A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-6.
- Myers, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L., Dew, I. M., Fasulo, D. P., Flanigan, M. J., Kravitz, S. A., Mobarry, C. M., Reinert, K. H., Remington, K. A., Anson, E. L., Bolanos, R. A., Chou, H. H., Jordan, C. M., Halpern, A. L., Lonardi, S., Beasley, E. M., Brandon, R. C., Chen, L., Dunn, P. J., Lai, Z., Liang, Y., Nusskern, D. R., Zhan, M., Zhang, Q., Zheng, X., Nakato, H., Fox, B., and Selleck, S. B. (2002). *dally*, a *Drosophila* member of the glypican family of integral membrane proteoglycans, affects cell cycle progression and morphogenesis via a Cyclin A-mediated process. *J Cell Sci* 115, 123-30.
- Nakato, H., Fox, B., and Selleck, S. B. (2002). *dally*, a *Drosophila* member of the glypican family of integral membrane proteoglycans, affects cell cycle progression and morphogenesis via a Cyclin A-mediated process, *J Cell Sci* 115, 123-30.

- Nieuwkoop, P. D., and Sutasurya, L. A. (1976). Embryological evidence for a possible polyphyletic origin of the recent amphibians. *J Embryol Exp Morphol* 35, 159-67.
- Nieuwkoop, P. D., and Sutasurya, L. A. (1979). *Primordial Germ Cells in the Chordates. Embryogenesis and Phylogenesis.* (Cambridge Univ. Press, Cambridge), 91.
- Nose, A., Isshiki, T., and Takeichi, M. (1998). Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the *msh* homeobox gene, *Development* 125, 215-23.
- Nose, A., Mahajan, V. B., and Goodman, C. S. (1992). Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell* 70, 553-67.
- Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Oh, E. S., Woods, A., and Couchman, J. R. (1997). Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem* 272, 8133-6.
- Pankratz, M. J., and Jäckle, H. (1993). *The Development of Drosophila Melanogaster.* (Blastoderm segmentation), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 467-516.
- Park, M., Venkatesh, T. V., and Bodmer, R. (1998). Dual role for the *zeste-white3/shaggy*-encoded kinase in mesoderm and heart development of *Drosophila*. *Dev Genet* 22, 201-11.
- Paterson, B. M., Walldorf, U., Eldridge, J., Dubendorfer, A., Frasch, M., and Gehring, W. J. (1991). The *Drosophila* homologue of vertebrate myogenic-determination genes encodes a transiently expressed nuclear protein marking primary myogenic cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3782-6.
- Paterson, B. M., Shirakata, M., Nakamura, S., Dechesne, C., Walldorf, U., Eldridge, J., Dubendorfer, A., Frasch, M., and Gehring, W. J. (1992). Isolation and functional comparison of Dmyd, the *Drosophila* homologue of the vertebrate myogenic determination genes, with CMD1. *Symp Soc Exp Biol* 46, 89-109.
- Paululat, A., Breuer, S., and Renkawitz-Pohl, R. (1999). Determination and development of the larval muscle pattern in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 296, 151-60.
- Paululat, A., Holz, A., and Renkawitz-Pohl, R. (1999). Essential genes for myoblast fusion in *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev* 83, 17-26.
- Perrimon, N., and Perkins, L. A. (1997). There must be 50 ways to rule the signal: the case of the *Drosophila* EGF receptor. *Cell* 89, 13-6.
- Perucho, M., Hanahan, D., Lipsich, L., and Wigler, M. (1980). Isolation of the chicken thymidine kinase gene by plasmid rescue. *Nature* 285, 207-10.
- Piepenburg, O., Vorbrüggen, G., and Jäckle, H. (2000). *Drosophila* segment borders result from unilateral repression of *hedgehog* activity by *wingless* signaling. *Mol Cell* 6, 203-9.
- Pirrotta, V. (1988). Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. *Biotechnology* 10, 437-56.

- Ramer, S. W., Elledge, S. J., and Davis, R. W. (1992). Dominant genetics using a yeast genomic library under the control of a strong inducible promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11589-93.
- Rapraeger, A. C., and Ott, V. L. (1998). Molecular interactions of the syndecan core proteins. *Curr Opin Cell Biol* 10, 620-8.
- Ray, E.J. 2001. <http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>.
- Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R., and Leptin, M. (1997). Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development* 124, 2915-22.
- Riechmann, V., Rehorn, K. P., Reuter, R., and Leptin, M. (1998). The genetic control of the distinction between fat body and gonadal mesoderm in *Drosophila*. *Development* 125, 713-23.
- Rifkin, J. L. (2001). Folate reception by vegetative *Dictyostelium discoideum* amoebae: distribution of receptors and trafficking of ligand. *Cell Motil Cytoskeleton* 48, 121-9.
- Roberts, D. B. (1986). *Drosophila* : a practical approach. New York, IRL Press at Oxford University Press.
- Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K., and Engels, W. R. (1988). A stable genomic source of *P* element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 461-70.
- Rørth, P. (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12418-22.
- Rørth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W., and Cohen, S. M. (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* 125, 1049-57.
- Rørth, P., Szabo, K., and Texido, G. (2000). The level of C/EBP protein is critical for cell migration during *Drosophila* oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation. *Mol Cell* 6, 23-30.
- Rose, D., Zhu, X., Kose, H., Hoang, B., Cho, J., and Chiba, A. (1997). Toll, a muscle cell surface molecule, locally inhibits synaptic initiation of the RP3 motoneuron growth cone in *Drosophila*. *Development* 124, 1561-71.
- Rothberg, J. M., Jacobs, J. R., Goodman, C. S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev* 4, 2169-87.
- Rubin, G. M., and Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors, *Science* 218, 348-53.
- Rubin, G. M., Adams, M. D., and Venter, J. C. (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science* 287, 2196-204.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M. V., and Bate, M. (2000). *Drosophila dumbfounded*: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* 102, 189-98.

- Ruiz-Gomez, M., Romani, S., Hartmann, C., Jäckle, H., and Bate, M. (1997). Specific muscle identities are regulated by Krüppel during *Drosophila* embryogenesis. *Development* *124*, 3407-14.
- Salzberg, A., Golden, K., Bodmer, R., and Bellen, H. J. (1996). *gutfeeling*, a *Drosophila* gene encoding an antizyme-like protein, is required for late differentiation of neurons and muscles. *Genetics* *144*, 183-96.
- Sambrook, J., and Russel, D. W. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Appendix 10 3.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* *74*, 5463-7.
- Sanson, B. (2001). Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation, *EMBO Rep* *2*, 1083-8.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J., and Technau, G. M. (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* *189*, 186-204.
- Schulman, B. A., Carrano, A. C., Jeffrey, P. D., Bowen, Z., Kinnucan, E. R., Finnin, M. S., Elledge, S. J., Harper, J. W., Pagano, M., and Pavletich, N. P. (2000). Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex, *Nature* *408*, 381-6.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., and Goodman, C. S. (1993). Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* *10*, 409-26.
- Seher, T. C., and Leptin, M. (2000). Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation, *Curr Biol* *10*, 623-9.
- Seydoux, G., and Strome, S. (1999). Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells. *Development* *126*, 3275-83.
- Shishido, E., Ono, N., Kojima, T., and Saigo, K. (1997). Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development* *124*, 2119-28.
- Silver, J. (1991). *Inverse polymerase chain reaction. PCR: A practical approach*. Oxford University Press, New York, 137-146.
- Silverman, N., and Maniatis, T. (2001). NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* *15*, 2321-42.
- Silverman, N., Zhou, R., Stoven, S., Pandey, N., Hultmark, D., and Maniatis, T. (2000). A *Drosophila* IkappaB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev* *14*, 2461-71.
- Skaer, H. (1993). *The Alimentary Canal. The Development of Drosophila melanogaster*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 941-1012.
- Smith, J. L., Wilson, J. E., and Macdonald, P. M. (1992). Overexpression of *oskar* directs ectopic activation of *nanos* and presumptive pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell* *70*, 849-59.

- Spradling, A. C., Stern, D. M., Kiss, I., Roote, J., Lavery, T., and Rubin, G. M. (1995). Gene disruptions using *P* transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10824-30.
- Spradling, A. C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E. J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S., and Rubin, G. M. (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single *P*-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes, *Genetics* 153, 135-77.
- Spring, J., Paine-Saunders, S. E., Hynes, R. O., and Bernfield, M. (1994). *Drosophila* syndecan: conservation of a cell-surface heparan sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3334-8.
- St Johnston, D. (1995). The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81, 161-70.
- St Johnston, D., Beuchle, D., and Nüsslein-Volhard, C. (1991). *staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66, 51-63.
- St Johnston, D., and Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68, 201-19.
- Starz-Gaiano, M., and Lehmann, R. (2001). Moving towards the next generation. *Mech Dev* 105, 5-18.
- Stein, J. A., Broihier, H. T., Moore, L. A., and Lehmann, R. (2002). Slow as molasses is required for polarized membrane growth and germ cell migration in *Drosophila*, *Development* 129, 3925-34.
- Sturtevant, A. H. (1913). The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J. Exper. Zool.* 14, 43-59.
- Sutherland, D., Samakovlis, C., and Krasnow, M. A. (1996). *branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87, 1091-101.
- Tanaka-Matakatsu, M., Uemura, T., Oda, H., Takeichi, M., and Hayashi, S. (1996). Cadherin-mediated cell adhesion and cell motility in *Drosophila* trachea regulated by the transcription factor Escargot, *Development* 122, 3697-705.
- Tautz, D., and Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98, 81-5.
- Technau, G. M., and Campos-Ortega, J. A. (1986). Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. III. Commitment and proliferative capabilities of pole cells and midgut progenitors. *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 195, 489-498.
- Tepass, U., and Hartenstein, V. (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 161, 563-96.
- Thisse, B., el Messal, M., and Perrin-Schmitt, F. (1987). The *twist* gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res* 15, 3439-53.
- Thor, S., Andersson, S. G., Tomlinson, A., and Thomas, J. B. (1999). A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* 397, 76-80.

- Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Fox, B., and Selleck, S. B. (2000). Structural analysis of glycosaminoglycans in animals bearing mutations in *sugarless*, *sulfateless*, and *tout-velu*. *Drosophila* homologues of vertebrate genes encoding glycosaminoglycan biosynthetic enzymes, *J Biol Chem* 275, 21856-61.
- Turner, F. R., and Mahowald, A. P. (1976). Scanning electron microscopy of *Drosophila* embryogenesis. 1. The structure of the egg envelopes and the formation of the cellular blastoderm. *Dev Biol* 50, 95-108.
- Tzortzatou-Stathopoulou, F., Mikraki, V., Xaidara, A., Moschovi, M., Evangelinos, V., and Panagopoulos, K. (1996). Activity of 5-formyl tetrahydrofolate cyclodehydrase and 5,10-methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase in primary brain tumors in children. *Pediatr Hematol Oncol* 13, 511-9.
- Van Doren, M., Broihier, H. T., Moore, L. A., and Lehmann, R. (1998). HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells. *Nature* 396, 466-9.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Sutton, G. G., Kerlavage, A. R., Smith, H. O., and Hunkapiller, M. (1998). Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 280, 1540-2.
- Verheyen, E. M., and Cooley, L. (1994). Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* 120, 717-28.
- Vincent, S., Ruberte, E., Grieder, N. C., Chen, C. K., Haerry, T., Schuh, R., and Affolter, M. (1997). DPP controls tracheal cell migration along the dorsoventral body axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 124, 2741-50.
- Volk, T. (1999). Singling out *Drosophila* tendon cells: a dialogue between two distinct cell types. *Trends Genet* 15, 448-53.
- Vorbrüggen, G., and Jäckle, H. (1997). Epidermal muscle attachment site-specific target gene expression and interference with myotube guidance in response to ectopic *stripe* expression in the developing *Drosophila* epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8606-11.
- Wei, X., and Ellis, H. M. (2001). Localization of the *Drosophila* MAGUK protein Polychaetoid is controlled by alternative splicing. *Mech Dev* 100, 217-31.
- Wilimzig, M. (1985). Technical Tips. *Trends Genet*.
- Williamson, A., and Lehmann, R. (1996). Germ cell development in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 365-91.
- Wills, Z., Marr, L., Zinn, K., Goodman, C. S., and Van Vactor, D. (1999). Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo. *Neuron* 22, 291-9.
- Wilson, R. (1999). Competent steps in determination of cell fate. *Bioessays* 21, 455-8.
- Wilson, R., and Leptin, M. (2000). Fibroblast growth factor receptor-dependent morphogenesis of the *Drosophila* mesoderm. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 891-5.
- Woods, A., and Couchman, J. R. (2001). Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr Opin Cell Biol* 13, 578-83.
- Wright, T. R. F. (1960). The phenogenetics of the embryonic mutant, *lethal myospheroid*, in *Drosophila melanogaster*. *J. Exper. Zool.* 143, 77-99

Yarnitzky, T., Min, L., and Volk, T. (1997). The *Drosophila* neuregulin homolog *Vein* mediates inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells, *Genes Dev* 11, 2691-700.

Yin, Z., and Frasch, M. (1998). Regulation and function of *tinman* during dorsal mesoderm induction and heart specification in *Drosophila*. *Dev Genet* 22, 187-200.

Zalokar, M., and Erk, I. (1976). Division and migration of nuclei during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J. Microbiology Cell.* 25, 97-106.

Zalokar, M., and Erk, I. (1977). Phase-partition fixation and staining of *Drosophila* eggs. *Stain Technol* 52, 89-95.

Zhang, N., Zhang, J., Cheng, Y., and Howard, K. (1996). Identification and genetic analysis of *wunen*, a gene guiding *Drosophila melanogaster* germ cell migration. *Genetics* 143, 1231-41.

Zur Lage, P. I. (1997). *Drosophila melanogaster* mRNA for ubiquitin activating enzyme., GenBank/EMBL/DDBJ Y15895.



## **1 Einleitung**

<b>Abb. 1-1</b>	„Der Sturm“ (Aeneas Darstellung)	1
1-2	Mechanismen der gerichteten Zellwanderung	4
1-3	Zellwanderungsprozesse in <i>Drosophila melanogaster</i>	5-6
1-4	Schritte der Keimzellwanderung in <i>Drosophila</i>	9
1-5	Darstellung der somatischen Muskulatur eines Abdominalsegments...	12
1-6	Regulatorische Prozesse bei der Muskel-Spezifizierung ...	15
1-7	Schematische Darstellung: modularer Fehlexpressions-„Screen“	17

## **2 Ergebnisse**

<b>Abb. 2-1</b>	Treiberlinie: <i>sr239ΔPanGal4</i> (Muster-Element)	19
<b>Tab. 2-A</b>	Kandidaten-Gene aus dem Fehlexpressions-„Screen“	21-23
<b>Abb. 2-2</b>	Fehlexpressionsphänotyp der <i>P{EP}</i> -Insertionslinie 21140	25
2-3	Expressionsmuster von <i>Sdc</i> während der Embryogenese...	27
2-4	Expressionsmuster von <i>Toll</i> während der Embryogenese...	28
2-5	Fehlexpressionsphänotyp der <i>P{EP}</i> -Insertionslinie 35059	29
2-6	Expressionsmuster von CG4963 während der Embryogenese...	30
2-7	Fehlexpressionsphänotyp der <i>P{EP}</i> -Insertionslinie 36553	32
2-8	Expressionsmuster von <i>aeneas</i> während der Embryogenese...	33
2-9	Doppel-Fluoreszenz-Färbung <i>aeneas in situ</i> / $\alpha$ Vasa Antikörper	34
2-10	Northern Blot-Analyse verschiedener Entwicklungsstadien...	36
2-11	Subzelluläre Lokalisation des Aeneas-eGFP-Fusionsprotein	37
2-12	Genomische Organisation des <i>aeneas</i> -Lokus ( <i>P{lacW}</i> -Linie <i>l(3)L1233</i> )	38
2-13	cDNA-Sequenz und konzeptionelle Translation des <i>aeneas</i> -Gens...	39
2-14	5-FTHF-Cyclo-Ligase Aktivität	40
2-15	Protein-Domänen in Aeneas	41
2-16	Genomische PCR Analyse der <i>P{lacW}l(3)L1233</i> -Linie	43
2-17	Rekombinations-Kreuzungsschema (Generierung der <i>l(3)L1233<sup>R80</sup></i> -Linie)	45
<b>Tab. 2-B</b>	Rekombinations-Frequenz	45
<b>Abb. 2-18</b>	RT-PCR Analyse der <i>aeneas</i> -Transkripte	46
2-19	Expression von <i>aeneas</i> in der homozygoten <i>P{lacW}</i> -Insertionslinie...	47
2-20	Polzellen-Phänotyp der homozygoten <i>P{lacW}</i> -Insertionslinie <i>l(3)L1233<sup>R80</sup></i>	49
2-21	Kreuzungsschema der <i>P{lacW}</i> -Element Exzision ( <i>l(3)L1233<sup>R80</sup></i> )	51
2-22	Genomische PCR-Analyse der Exzisions-Linien	52
2-23	Genomische Organisation des <i>aeneas</i> -Lokus ( $\Delta$ <i>l(3)L1233<sup>R80-C2</sup></i> )	53
2-24	Gestörte Polzellwanderung in $\Delta$ <i>l(3)L1233<sup>R80-C2</sup></i> / <i>Df(3R)Z1</i> Embryonen	55

**3 Diskussion**

<b>Abb. 3-1</b>	Erklärungsmöglichkeiten für die Entstehung eines Muskelphänotyps	58
<b>Tab. 3-A</b>	Proteinfunktionsgruppen [PFG]	59

**4 Material & Methoden**

<b>Tab. 4-A</b>	Klonierungsvektoren	74
4-B	Vektoren zur <i>Drosophila</i> -Keimbahn-Transformation	74
4-C	DNA-Konstrukte	74
4-D	PCR-Programm (inverse PCR)	77
4-E	PCR-Programm (genomische PCR)	79
4-F	PCR-Programm (RT-PCR)	80
4-G	Liste der verwendeten Primärantikörper	82
4-H	Fliegenstämme	83
4-I	Fliegenstämme für Gal4/UAS-Experimente	85

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Gerd Vorbrüggen in der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie, am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, durchgeführt.

Mein Dank gilt im Besonderen Dr. Gerd Vorbrüggen für die Bereitstellung des Projekts, seine stete Diskussionsbereitschaft und die Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Prof. Dr. Herbert Jäckle möchte ich dafür danken, dass ich die Arbeiten zu dieser Dissertation in der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie durchführen konnte, für seine kritische Begleitung des Projekts und hilfreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. H.-H. Arnold danke ich für die Betreuung der Arbeit an der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität zu Braunschweig.

Den Mitgliedern von Labor 5 danke ich für viele Hilfestellungen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich Nicole Staudt und Sonja Fellert für ihre Freundschaft, zahlreiche inspirierende Gespräche und ihre Hilfsbereitschaft bei technischen und wissenschaftlichen Fragestellungen.

Nicole Beinert, Gordon Dowe und Sonja Fellert waren durch ihre Unterstützung bei inverse PCR-Experimenten, DNA-Sequenzierungen, Injektionen und vielem mehr von unschätzbarem Wert.

Zu Dank verpflichtet bin ich der DeveloGen AG, der Stammsammlung Bloomington, sowie P. Rørth und R. Lehmann für die Bereitstellung von Fliegenstämmen.

Plasmide bzw. Antikörper erhielt ich von B. Linder-Stuart, P. Lasko und P. Kiehart.

Bei allen Mitgliedern der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und ein angenehmes Arbeitsklima, das wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ich konnte während meiner Zeit am MPI viele interessante Menschen kennen lernen und einige Freundschaften schließen.

Vielen Dank dafür: Annette, Faye, Michael, Mitsuko, Nicole, Sarah, Sonja und Wendy.

Die intensive Auseinandersetzung mit der Forschung wäre nicht ohne den Rückhalt meiner Familie, durch meine Mutter und Schwester, möglich gewesen.

Niemand hat die Höhen und Tiefen dieser Arbeit so direkt gespürt und mitgetragen wie Nicole. Vielen Dank für Deine Liebe und Unterstützung.

**Andreas Molitor**

- 03.05.1969      Geboren in Gelsenkirchen-Horst (NRW)  
Eltern: Hans Molitor und Dorothea Molitor, geb. Knobel
- 1975 - 1979      Besuch der Grundschule (Niederaußem)
- 1975 - 1985      Besuch der Albert-Einstein-Realschule (Oberaßem)
- 1985 - 1988      Besuch des Erftgymnasiums (Bergheim-Erft)
16. Mai 1988      Abitur am Erftgymnasium (Bergheim-Erft)
- 1988 - 1989      Grundwehrdienst beim Luftwaffenregiment (Nörvenich)
- 1990 - 1991      Praktikum Fa. Zippel NetMarket (Heppendorf)
- 1991 - 1993      Grundstudium Biologie an der Universität zu Köln (Math.-Nat. Fakultät)
- Dez. 1993      Diplom-Vorprüfung in Zoologie, Botanik, Physik und Chemie
- 1993 - 1997      Hauptstudium Entwicklungsbiologie, Zoologie und Biochemie
- Nov. 1997      Diplomprüfungen in Entwicklungsbiologie, Zoologie und Biochemie
- 1994 - 1995      Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Neurophysiologie der  
Universität zu Köln in der Medizinischen Fakultät: Prof. Dr. J. Hescheler,  
AG Dr. G. Brönner  
„Klonierung und Charakterisierung von  
Kalziumkanälen in *Drosophila melanogaster*“
13. Nov. 1997      Diplom an der Universität zu Köln
- bis Apr. 1998      Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Neurophysiologie  
der Universität zu Köln
- seit Mai 1998      Anfertigung der Dissertation am Max-Planck-Institut für biophysikalische  
Chemie in Göttingen, in der Abteilung von Prof. Dr. H. Jäcke,  
AG Dr. G. Vorbrüggen:  
„Isolierung und Charakterisierung des *aeneas*-Gens  
von *Drosophila melanogaster*“
- seit Jan. 2002      „Junior Scientist“ DeveloGen AG, Göttingen